

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-514917

(P2005-514917A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 1/00	4 B O 2 9
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 3
		4 B O 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 144 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-532655 (P2003-532655)	(71) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成14年10月3日 (2002.10.3)		インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月31日 (2004.5.31)		アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/032032	(74) 代理人	100089266
(87) 国際公開番号	W02003/029437		弁理士 大島 陽一
(87) 国際公開日	平成15年4月10日 (2003.4.10)	(72) 発明者	ユエ、ヘンリー
(31) 優先権主張番号	60/326,945		アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サニーベイル・ルイスアベニュー 826
(32) 優先日	平成13年10月3日 (2001.10.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/343,718		
(32) 優先日	平成13年10月19日 (2001.10.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/343,980		
(32) 優先日	平成13年11月2日 (2001.11.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 分泌タンパク質

(57) 【要約】

本発明の種々の実施態様はヒト分泌タンパク質 (S E C P)、および S E C P を同定しコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明の実施例はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。本発明の別の実施態様はまた、S E C P の異常発現に関連する疾患を、診断、治療または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下からなる群から選択した単離されたポリペプチド。

(a) SEQ ID NO:1-32 (配列番号 1 乃至 32) からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) SEQ ID NO:1-6、SEQ ID NO:10-11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21-23、SEQ ID NO:26-27 及び SEQ ID NO:31 からなる群から選択した或るアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) SEQ ID NO:8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(d) SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:20 及び SEQ ID NO:29 からなる群から選択した或るアミノ酸配列と少なくとも 95% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(e) SEQ ID NO:15 のアミノ酸配列に対して少なくとも 93% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(f) SEQ ID NO:19 のアミノ酸配列に対して少なくとも 96% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(g) SEQ ID NO:24-25 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 99% が同一であるような天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(h) SEQ ID NO:30 のアミノ酸配列に対して少なくとも 92% が同一であるような天然アミノ酸配列を含むポリペプチド

(i) SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、及び

(j) SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片

【請求項 2】

SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 2 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO:33-64 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含む請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドへ機能的に連結したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを有する遺伝形質転換生物。

【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドを生産する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換される細胞を培養する過程と、

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程とからなる方法。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択した或るアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

ことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項 1 2】

以下からなる群から選択した単離されたポリヌクレオチド。

(a) SEQ ID NO:33-64からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO:33-48、SEQ ID NO:50-51、SEQ ID NO:53-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 90% が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(c) SEQ ID NO:49のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 93% が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(d) SEQ ID NO:52のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも 97% が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(e) (a) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(f) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(g) (c) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(h) (d) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(i) (a) ~ (h) の RNA 等価物

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを持つ、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を持つ少なくとも 20 の連続したヌクレオチドを持つプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程とを含む方法。

【請求項 1 5】

前記プローブが少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

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

(b) 前記の増幅した標的ポリヌクレオチド又はその断片の有無を検出し、該標的ポリヌクレオチド又はその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 1 8】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-32からなる群から選択されたアミノ酸配列を持つことを特徴とする、請求項 1 7 の組成物。

【請求項 1 9】

機能的な SECP の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項 1 7 の組成物を投与することを特徴とする治療方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 20】

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

- (a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、
- (b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法で同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。

10

【請求項 22】

機能的な SECP の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項 21 の組成物を投与することを特徴とする治療方法

。

【請求項 23】

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

- (a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、
- (b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 24】

請求項 23 の方法で同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを有する組成物。

【請求項 25】

機能的な SECP の過剰な発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項 24 の組成物を投与することを特徴とする治療方法

。

【請求項 26】

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

- (a) 請求項 1 のポリペプチドを適切な条件下で少なくとも 1 つの試験化合物と混合する過程と、
- (b) 請求項 1 のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項 1 のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程を含む方法。

30

【請求項 27】

請求項 1 のポリペプチドの活性をモジュレート（調節）する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 請求項 1 のポリペプチドの活性が許容される条件下で、請求項 1 のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物と混合する過程と、
- (b) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、
- (c) 試験化合物の存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性と比較する過程を含み、試験化合物の存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。

40

【請求項 28】

請求項 5 の配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変するのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
- (b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現改変を検出する過程と、
- (c) 可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオ

50

チドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 29】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

- (a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、
- (b) 処理した前記生物学的サンプルの核酸と、請求項 12 のポリヌクレオチドの少なくとも 20 の連続するヌクレオチドを持つプローブをハイブリダイズさせる過程であって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項 12 のポリヌクレオチド又はその断片のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである、前記過程と、
- (c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量する過程と、
- (d) 前記処理された生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生物学的サンプル中のハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示するような方法。

10

【請求項 30】

生物学的サンプル中の S E C P の発現に関連する症状又は疾患に対する診断試験する方法であって、

- (a) 前記生物学的サンプルと請求項 11 の抗体との混合を、前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体を形成するのに適した条件下で行う過程と
- (b) 前記複合体を検出する過程とを含み、前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。

20

【請求項 31】

請求項 11 の抗体であって、

- (a) キメラ抗体
- (b) 単鎖抗体
- (c) F a b 断片
- (d) (a b ')₂ 断片
- (e) ヒト化抗体のいずれかである抗体。

30

【請求項 32】

請求項 11 に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを有する組成物。

【請求項 33】

被検者の S E C P の発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項 32 に記載の組成物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 34】

前記抗体が標識されることを特徴とする、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 35】

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

40

【請求項 36】

請求項 11 の抗体の特異性を持つポリクローナル抗体を調製する方法であって、

- (a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、
- (b) 前記動物から抗体を単離する過程と、
- (c) 前記単離された抗体を前記ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結合するポリクローナル抗体を同定する過程とを含むような方法。

【請求項 37】

請求項 36 の方法で産生したポリクローナル抗体。

50

【請求項 38】

請求項 37 のポリクローナル抗体と好適なキャリアとを有する組成物。

【請求項 39】

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

- (a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むポリペプチドを用いて動物を免疫化する過程と、
- (b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、
- (c) 前記抗体産出細胞と不死化した細胞とを融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、
- (d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、
- (e) SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異結合するようなモノクローナル抗体を前記培養物から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 40】

請求項 39 に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項 41】

請求項 40 に記載のモノクローナル抗体と適切なキャリアとを有する組成物。

【請求項 42】

F a b 発現ライブラリのスクリーニングによって前記抗体を産出することを特徴とする、請求項 11 に記載の抗体。

20

【請求項 43】

組換え免疫グロブリンライブラリをスクリーニングすることにより産出される、請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 44】

サンプル中の SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出する方法であって、

- (a) 請求項 11 に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と 1 サンプルとをインキュベートする過程と、
- (b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。

30

【請求項 45】

SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

- (a) 請求項 11 に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と 1 サンプルとをインキュベートする過程と、
- (b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO:1-32 からなる群から選択したアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 46】

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

40

【請求項 47】

ポリヌクレオチド群を有する或るサンプルの発現プロファイルを作製する方法であって、

- (a) サンプル中のポリヌクレオチドを標識化する過程
- (b) ハイブリダイゼーション複合体が形成されるのに適した条件下で請求項 46 のマイクロアレイのエLEMENT とサンプル中の標識化ポリヌクレオチドとを接触させる過程と、
- (c) サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量する過程を含む方法

50

【請求項 48】

固体基板上の固有の物理的位置に付着された種々のヌクレオチド分子を有するアレイであって、少なくとも1つの前記ヌクレオチド分子が、或る標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチド群と特異的にハイブリダイズ可能な最初のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列を含み、前記の標的ポリヌクレオチドが請求項12に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするアレイ。

【請求項 49】

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

10

【請求項 50】

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

【請求項 51】

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

【請求項 52】

請求項48に記載のアレイで、マイクロアレイであることを特徴とするアレイ。

【請求項 53】

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

20

【請求項 54】

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

【請求項 55】

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

30

【請求項 56】

SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 57】

SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 58】

SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 59】

SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

40

【請求項 60】

SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 61】

SEQ ID NO:6のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 62】

SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 63】

SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 64】

SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

50

- 【請求項 6 5】
SEQ ID NO:10のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 6 6】
SEQ ID NO:11のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 6 7】
SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 6 8】
SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 6 9】
SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。 10
- 【請求項 7 0】
SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 7 1】
SEQ ID NO:16のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 7 2】
SEQ ID NO:17のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 7 3】
SEQ ID NO:18のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 7 4】
SEQ ID NO:19のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。 20
- 【請求項 7 5】
SEQ ID NO:20のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 7 6】
SEQ ID NO:21のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 7 7】
SEQ ID NO:22のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 7 8】
SEQ ID NO:23のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 7 9】
SEQ ID NO:24のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。 30
- 【請求項 8 0】
SEQ ID NO:25のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 8 1】
SEQ ID NO:26のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 8 2】
SEQ ID NO:27のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 8 3】
SEQ ID NO:28のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 8 4】
SEQ ID NO:29のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。 40
- 【請求項 8 5】
SEQ ID NO:30のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 8 6】
SEQ ID NO:31のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 8 7】
SEQ ID NO:32のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 8 8】
SEQ ID NO:33のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。
- 【請求項 8 9】
SEQ ID NO:34のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。 50

【請求項 1 1 5】

SEQ ID NO:60のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 1 6】

SEQ ID NO:61のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 1 7】

SEQ ID NO:62のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 1 8】

SEQ ID NO:63のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 1 9】

SEQ ID NO:64のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規の核酸群、これら核酸によってコードされる分泌タンパク質、ならびに、これらの核酸とタンパク質とを利用した、細胞増殖異常、自己免疫/炎症疾患、心臓血管疾患、神経疾患及び発達障害の診断、治療及び予防に関する。本発明はまた、該核酸群及び分泌タンパク質群の発現への、外因性化合物の効果のアセスメントに関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質の輸送及び分泌は、細胞機能のために必須である。タンパク質の輸送は、輸送又は分泌されるタンパク質のアミノ末端に存在するシグナルペプチドによって媒介される。シグナルペプチドは、約10から20の疎水性アミノ酸群からなり、新生タンパク質をリボソームから小胞体(ER)のような特定の膜で囲まれた区画まで導く。ERを標的とするタンパク質には、分泌経路を進むものとER、ゴルジ体若しくはリソソームなど、分泌細胞器官に残るものがある。分泌経路を進むタンパク質は、細胞外空間へ分泌されるか、又は原形質膜内に残る。原形質膜内に保持されるタンパク質は1つ以上の膜貫通ドメインを有し、その各々が約20の疎水性アミノ酸残基からなる。分泌タンパク質は、通常、不活性の前駆体として合成され、分泌経路を移動する際に翻訳後プロセッシング現象によって活性化される。そのような現象の例として、グリコシル化、タンパク質分解、及びシグナルペプチダーゼによるシグナルペプチドの除去が挙げられる。タンパク質の運搬の間に起こり得るその他のイベントの例として、新生タンパク質のシャペロン依存アンフォールディング及びフォールディング、及び受容体若しくは細孔複合体とタンパク質の相互作用が挙げられる。アミノ末端シグナルペプチドを有する分泌タンパク質の例は以下に述べるが、これらには細胞間シグナル伝達において重要な役割を有するタンパク質が含まれる。そのようなタンパク質の例として、膜貫通受容体及び細胞表面マーカー、細胞外基質分子、サイトカイン、ホルモン、成長因子及び分化因子、酵素、ニューロペプチド、血管介在物質(vasomediators)、細胞表面マーカー、及び抗原認識分子がある(Alberts, B.他(1994) Molecular Biology of The Cell, Garland Publishing, New York, NY, 557-560, 582-592 ページの概説を参照)。

20

30

【0003】

細胞表面マーカーの例としては、免疫系の白血球細胞上で同定される細胞表面抗原がある。これらの抗原を同定するには、系統的な、モノクローナル抗体(mAb)ベースの「ショットガン(shot gun)」技術が利用される。これらの技術によって、数百種のmAbが、未知の細胞表面白血球抗原類に対して産生されている。それらの抗原は「分化のクラスター群」へとグループ分けされている。分類は、多様な分化白血球細胞型と未分化白血球細胞型とで共通の、免疫細胞化学的な局在パターンに基づく。或るクラスター内の抗原群は或る単一の細胞表面タンパク質を同定すると仮定され、「分化クラスター」すなわち「CD(cluster of differentiation)」名が指定されている。CD抗原類によって同定されるタンパク質類をコードするいくつかの遺伝子が、標準的な分子生物学技術によってクローン化され、確認されている。CD抗原類の特徴は、膜貫通タンパク質であることと、細胞表面

40

50

タンパク質であって脂肪酸含有糖脂質、例えばグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) への共有結合性の接着を介して原形質膜に固着されていることである (Barclay, A. N.他 (1995) The Leucocyte Antigen Facts Book, Academic Press, San Diego, CA, 17-20ページの概説を参照)。

【0004】

基質タンパク質 (MP) は膜貫通タンパク質と細胞外タンパク質であり、組織の形成、成長、再形成、及び維持、並びに、炎症反応の重要な介在物質及び制御因子として機能する。MPの発現及び均衡は、先天的疾患、後成的疾患、若しくは感染性疾患の結果として生じる生化学的变化によって乱されることがある。また、MPIは、免疫応答における白血球の遊走、増殖、分化、及び活性化に影響を与える。MPは、コラーゲン様ドメイン、EGF様ドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、及びフィブロネクチン様ドメインを含む1つ以上のドメインの存在によってしばしば特徴づけられる。加えて、MPは重度にグリコシル化されることがある。また、接着相互作用の役割を果たすことのあるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) トリペプチドモチーフを含むことがある。MPの例としては、細胞外タンパク質として、フィブロネクチン、コラーゲン、ガレクチン (galectin)、ビトロネクチン及びそのタンパク質分解誘導体ソマトメジンBがあり、また細胞接着受容体として、細胞接着分子 (CAM)、カドヘリン、及びインテグリンがある (Ayad, S. 他 (1994) The Extracellular Matrix Facts Book, Academic Press, San Diego, CA, 2-16ページ、Ruoslahti, E. (1997) *Kidney Int.* 51: 1413-1417、Sjaastad, M. D.及び Nelson, W. J. (1997) *BioEssays* 19:47-55に概説されている)。

10

20

【0005】

ムチンは、非常にグリコシル化された糖タンパクで、粘液ゲルの主要な構成成分である。ムチンの生理学的機能は、細胞保護、機械的保護、分泌液の粘性維持、及び細胞認識である。MUC6はヒトの胃ムチンであり、胆嚢、膵臓、精液小胞、及び女性の生殖管にも見つけられる (Toribara, N.W. 他 (1997) *J. Biol. Chem.* 272:16398-16403)。MUC6の遺伝子はヒトの11番染色体にマップされている (Toribara, N.W., 他 (1993) *J. Biol. Chem.* 268:5879-5885)。ヘモムチンは新規のショウジョウバエの表面ムチンであり、抗菌エフェクター分子の誘導に関与している可能性がある (Theopold, U., 他 (1996) *J. Biol. Chem.* 271:12708-12715)。

【0006】

タフテリン類 (tuftelin) は、これまでに同定された、異なる4つのエナメル基質タンパク質の1つである。他の3つの既知のエナメル基質タンパク質は、アメロゲニン、エナメルイン及びアメロプラスチンである。これらの成分タンパク質からのエナメル細胞外基質のアセンブリは、無機質置換されるための基質成分の産生において重要であると考えられている (Paine C.T.他 (1998) *Connect Tissue Res.* 38:257267)。タフテリンmRNAは、非ミネラル化歯原性腫瘍であるヒトエナメル上皮腫において発現されることが発見されている (Deutsch D. (1998) *Connect. Tissue Res.* 39:177184)。

30

【0007】

オルファクトメジン (olfactomedin) 関連タンパク質群は、保存されたC末端モチーフを有する、細胞外基質の分泌性糖タンパク質である。これらは、多様な組織に、また、線虫からヒトにいたる広範囲の種にわたって発現される。オルファクトメジン関連タンパク質群は、ヒトにおいて少なくとも5つのファミリーメンバーを持つ遺伝子ファミリーを構成する。この5つのうちの1つであるTIGR/ミオシリン (myocilin) タンパク質は目で発現し、緑内障の病原と関連している (Kulkarni, N.H. 他 (2000) *Genet. Res.* 76:41-50)。Yokoyama, M. 他 (1996) による研究では、AMYと呼ばれる135アミノ酸のタンパク質は、神経芽細胞腫細胞系 cDNAライブラリのラット神経細胞のオルファクトメジン関連ER局在性タンパク質に96%の配列同一性を有することが発見され、これはAMYの神経組織における役割が重要であることを示している (Yokoyama, M. 他, (1996) *DNA Res.* 3:311-320)。ラット脳のcDNAライブラリから単離された神経細胞特異的オルファクトメジン関連糖タンパク質は、オルファクトメジンとの強い配列類似性を示す。この類似性は、神経細胞と

40

50

神経分泌細胞において、これらの糖タンパク質が基質に関連した機能があることを示唆している (Danielson, P.E.他(1994) J. Neurosci. Res. 38:468-478)。

【0008】

Mac-2 結合タンパク質は90KDaの血清タンパク質(90K)であり、ヒト乳癌細胞系SK-BR-3及びヒト母乳の両方から単離された分泌性糖タンパク質である。これは、ヒトマクロファージ関連レクチンであるMac-2に特異的に結合する。成熟タンパク質の構造については、その長さが567アミノ酸で、18アミノ酸リーダーが、その前に付いている。16のシステイン群と、7つの潜在的N連結グリコシル化部位とがある。最初の106アミノ酸は、マクロファージスカベンジャー受容体のシステインリッチドメインによって定義される古いタンパク質スーパーファミリーに極めて類似したドメインを示す (Koths, K. 他(1993) J. Biol. Chem. 268:14245-14249)。90Kはエイズ患者の亜集団群の血清中で上昇し、初代腫瘍サンプルと腫瘍細胞株とにおいて多様なレベルで発現される。Ullrich A.他(1994; J. Biol. Chem. 269:18401-18407)は90Kが複数の宿主防御系を刺激し、インターロイキン2の分泌を誘発し得ることを実証した。この免疫刺激は発癌性形質変換、ウイルス感染又は、病原体の侵入の結果であることが提唱されている(Ullrich 他、前出)。

【0009】

セマフォリン(semaphorin)類は軸索誘導分子の1大グループで少なくとも30種のメンバーがあり、脊椎動物、無脊椎動物、更には数種のウイルスでも発見されている。すべてのセマフォリンは長さが約500アミノ酸のセマ(sema)ドメインを有する。セマフォリン受容体であるニューロピリンは、*in vitro*で神経突起の伸展成長を促進することが示されている。ニューロピリンの細胞外領域はCUB、ジスコイジン(discoidin)、及びMAMドメインの3種のドメインからなる。ニューロピリンのCUBモチーフ及びMAMモチーフはタンパク質間相互作用において幾つかの役割を果たすことが示唆されており、またセマドメイン及びC末端ドメインを介してセマフォリン類の結合に関与すると考えられる(Raper, J.A.(2000) Curr. Opin. Neurobiol. 10:88-94の概説を参照)。プレキシン(plexin)類は神経細胞表面分子であり、カルシウムイオンの存在下で同種親和性結合メカニズムにより細胞接着を媒介する。プレキシン類は、特定の感覚系の受容体や神経細胞において発現することがわかっている(Ohta, K. 他(1995) Cell 14:1189-1199)。いくつかのプレキシシンが、発生段階の神経系において運動神経軸索や中枢神経軸索の誘導を制御するよう機能することを示す証拠もある。プレキシンは、それ自体完全なセマフォリンドメインを有しており、古典的セマフォリンとセマフォリンの結合パートナーの両方の祖先であり得る(Winberg, M.L.他(1998) Cell 95:903-916)。

【0010】

ヒト妊娠特異的 1糖タンパク質(PSG)は、分子量が72KDa、64KDa、62KDa及び54KDaの、密接に関連する糖タンパク質類の1ファミリーである。PSGは、癌胎児性抗原と共に、免疫グロブリンスーパーファミリー内の一つのサブファミリーを構成する(Plouzek C.A. 及びChou J.Y.(1991) Endocrinology 129:950958)。PSGの様々な亜集団がヒト胎盤の栄養胚葉、及び羊膜や漿膜によって産生されることが発見されている(Plouzek C.A. 他(1993) Placenta 14:277285)。

【0011】

捻転ジストニアは常染色体優性運動疾患で、不随性筋収縮からなる。この疾患はtorsin AをコードするDYT-1遺伝子での3塩基対突然変異に関連するとされている(Ozelius, L.J. 他(1997) Nat. Genet. 17:40-48)。TorsinAは、ヒト、ラット、マウス、及び線虫で保存されているATPaseシャペロンのHsp100/Clpファミリーに対して著しい相同性を示す。神経細胞過程におけるDYT-1の強い発現はシナプス伝達においてtorsinが関与し得ることを示している(Kustedjo, K. 他(2000) J. Biol. Chem. 275:27933-27939 及びKonakova M. 他(2001) Arch. Neurol. 58:921-927)。

【0012】

自己分泌型運動促進因子(autocrine motility factor: AMF)は腫瘍細胞の遊走を調節する運動性サイトカインの1つであり、したがって、それに伴うシグナル伝達経路の同定

10

20

30

40

50

は決定的に重要である。自己分泌型運動促進因子受容体 (Autocrine motility factor receptor: AMFR) の発現は、胸腺腫における腫瘍の進行に関連することがわかっている (Oh ta Y. 他 (2000) *Int. J. Oncol.* 17:259264)。AMFRは、分子量78KDaの細胞表面糖タンパク質である。

【0013】

ホルモンは、血液循環により運ばれ、標的細胞の表面の又は内部の特異的受容体に結合する分泌分子である。ホルモンは多様な生化学的組成や作用機構を持っているが、2つのカテゴリーに分類し得る。第1のカテゴリーは小さい親油性ホルモンで、標的細胞の原形質膜を通過して拡散し、サイトゾル内受容体又は核内受容体に結合し、複合体を形成して遺伝子発現を改変する。これらの分子としては、レチノイン酸やチロキシンが、更には、プロゲステロン、エストロゲン、テストステロン、コルチゾール、アルドステロンなどの、コレステロール由来ステロイドホルモンがある。第2のカテゴリーに含まれる親水性ホルモンは、原形質膜の内側へ信号を伝達する細胞表面受容体に結合することで機能する。そのようなホルモンの例としては、アミノ酸の誘導体としてカテコールアミン類 (エピネフリン、ノルエピネフリン) 及びヒスタミンがあり、ペプチドホルモンとしてグルカゴン、インスリン、ガストリン、セクレチン、コレシストキニン、副腎皮質刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、及びバソプレッシンがある (Lodish 他 (1995) *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books Inc., New York, NY, 856-864ページなど参照)。

10

【0014】

プロオピオメラノコルチン (POMC) は、脳下垂体前葉が合成するホルモンであるコルチコトロピン (ACTH) の前駆体ポリペプチドであり、副腎皮質の刺激で機能する。POMCはまた、リポトロピンホルモン (-LPH) の前駆体ポリペプチドでもある。各ホルモンは、固有の生物活性を持つより小さいペプチド群を含む。 -メラニン細胞刺激ホルモン (-MSH) と副腎皮質刺激ホルモン様中葉ペプチド (corticotropin-like intermediate lobe peptide: CLIP) はACTHから形成され、 -リポトロピン (-LPH) と -エンドルフィン は -LPHのペプチド成分であるが、 -MSHは -LPH中に含有される。POMCのエキソン2及び3における1つの遺伝子突然変異に起因するACTH欠乏による副腎不全は、早期発症肥満症、副腎不全及び赤毛色素沈着を特徴とする内分泌性疾患を生じる (Chretien, M.他 (1979) *Can. J. Biochem.* 57:1111-1121; Krude, H. 他 (1998) *Nat. Genet.* 19:155-157; Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 176830)。

20

30

【0015】

成長因子類及び分化因子類は、細胞間伝達の中で機能する分泌タンパク質である。いくつかの因子の活動には、オリゴマー形成が、又は膜タンパク質との会合が必要である。それらの因子とそれらの受容体間の複雑な相互作用は、細胞分裂、細胞分化、細胞シグナル伝達及び細胞運動性を刺激又は抑制する、細胞内信号伝達経路の引き金となる。殆どの成長及び分化因子は、その局所環境にある細胞に作用する (パラ分泌シグナル伝達)。成長因子類及び分化因子類には3つの主要なクラスがある。第1のクラスには、上皮成長因子、線維芽細胞成長因子、トランスフォーミング成長因子、インシュリン様成長因子、及び血小板由来の成長因子など、大きなポリペプチド成長因子を含む。第2のクラスには、コロニー刺激因子 (CSF) のような造血性成長因子を含む。造血性成長因子類は、Bリンパ球、Tリンパ球、赤血球、血小板、好酸球、好塩基球、好中球、マクロファージ、及びそれらの幹細胞前駆体など、血液細胞の増殖及び分化を刺激する。第3のクラスには、ボンベシン、バソプレッシン、オキシトシン、エンドセリン、トランスフェリン、アンジオテンシンII、血管作用性小腸ペプチド、及びブラジキニンなど、小さなペプチド因子類を含み、これらは増殖以外の細胞機能を調節するホルモンとして機能する。

40

【0016】

成長因子及び分化因子は、*in vitro*での細胞の腫瘍性転換、及び*in vivo*での腫瘍進行において、幾つかの重大な役割を果たす。腫瘍細胞による、成長因子の不適正な発現は、腫瘍の血管新生及び転移に寄与し得る。造血時の成長因子の調節異常によって、貧血、白

50

血病、及びリンパ腫が生じ得る。インターフェロンなど幾つかの成長因子は、*in vitro*及び*in vivo*の双方で、腫瘍細胞群に対し細胞毒性を持つ。更に、幾つかの成長因子及び成長因子受容体は、構造的にも機能的にも腫瘍性タンパク質類と関連する。加えて、成長因子は癌原遺伝子群及び腫瘍抑制遺伝子群の双方の転写調節に影響を与える (Pimentel, E. (1994) Handbook of Growth Factors, CRC Press, Ann Arbor, MI, 1-9ページの概説を参照)。

【0017】

最初にショウジョウバエにおいて同定されたSlitタンパク質は、中枢神経系正中線形成及びおそらく神経組織の組織発生と軸索の誘導において重要である。Itoh他(1998; Brain Res. Mol. Brain Res. 62:175-186)は、slit遺伝子の哺乳類相同体(ヒト Slit-1、Slit-2、Slit-3 及びラット Slit-1)を同定した。コードされるタンパク質群は推定上の分泌タンパク質であり、EFG様モチーフ及びロイシンリッチリピートを持つが、これらは共に、保存されたタンパク質間相互作用ドメインである。Slit-1mRNA、Slit-2mRNA及びSlit-3mRNAは、それぞれ脳、脊髄、甲状腺に発現される(Itoh, 他、前出)。タンパク質のSlitファミリーは神経組織内のglypican-1の機能性リガンドであることが示されており、このことは、それらの相互作用は中枢神経系の組織発生時の特定の段階において重要であることを意味する(Liang, Y. 他(1999) J. Biol. Chem. 274:17885-17892)。

10

【0018】

神経ペプチド及び血管介在物質(NP/VM)は、内因性シグナル伝達分子の1大ファミリーを構成する。NP/VMファミリーに含まれる分子は、神経ペプチド及び神経ペプチドホルモンとして、ボンベシン、神経ペプチドY、ニューロテンシン、ニューロメディンN、メラノコルチン類、オピオイド類、ガラニン、ソマトスタチン、タキキニン類、ウロテンシンII及び平滑筋刺激に関する関連ペプチド類、バソプレッシン、及び血管作用性小腸ペプチドがある。また、循環系に運ばれるシグナル伝達分子として、アンジオテンシン、補体、カルシトニン、エンドセリン類、ホルミルメチオニルペプチド類、グルカゴン、コレシストキニン、及びガストリンがある。NP/VMは直接にシグナルを伝達し得る他、別の神経伝達物質及びホルモンの活性若しくは放出をモジュレートしたり、またカスケードで触媒酵素として作用することができる。NP/VMの効果は、ごく短時間のものから長期間持続するものまで幅広い(Martin, C.R. 他(1985) Endocrine Physiology, Oxford University Press, New York, NY, 57-62ページの概説を参照)。

20

30

【0019】

NP/VMは、多くの神経障害及び心血管障害に関与する。例えば、神経ペプチドYは、高血圧症、鬱血心不全、情動障害、食欲調節に関与する。ソマトスタチンは、下垂体前葉での成長ホルモン及びプロラクチンの分泌を阻害し、また、腸、膵臓腺房細胞、及び膵臓細胞内の分泌も阻害する。ソマトスタチンレベルの低下は、アルツハイマー病及びパーキンソン病で報告された。バソプレッシンは、腎臓内で水分吸収及びナトリウム吸収を増加させ、また高濃度では、血管平滑筋の収縮、血小板活性化、及び肝臓内でのグリコーゲン分解を刺激する。バソプレッシン及びその類似体は、尿崩症の治療のため臨床的に用いられる。エンドセリン及びアンジオテンシンは高血圧症に関与し、アンジオテンシンの血漿レベルを減少させるカプトプリルのような薬剤は、血圧を下げるのに用いられる(Watson, S.及びS. Arkininstall, (1994) The G-protein Linked Receptor Facts Book, Academic Press, San Diego CA, 194、252、284、55、及び111の各ページ)。

40

【0020】

神経ペプチドはまた、侵害受容(痛覚)にも役割を幾つか持つことが示されている。血管作用性小腸ペプチドは、慢性神経障害痛において重要な役割を果たすようである。オピオイド受容体様1受容体に対する内因性リガンドであるノシセプチンは、主に抗侵害受容作用を有すると考えられ、強直性の痛み若しくは慢性痛の、様々な動物モデルにおいて鎮痛特性を有している事が示された(Dickinson, T.及びFleetwood-Walker, S. M. (1998) Trends Pharmacol. Sci. 19:346-348)。

【0021】

50

シグナルペプチドを有する他のタンパク質として、酵素活性を持つ分泌タンパク質類がある。そのような酵素活性としては、例えば、オキシドレダクターゼ/デヒドロゲナーゼ活性、トランスフェラーゼ活性、加水分解酵素活性、リアーゼ活性、異性化酵素活性、若しくはリガーゼ活性がある。例えば、基質メタロプロテイナーゼは細胞外基質を分解する分泌性加水分解酵素であり、したがって、腫瘍転移、組織形態形成、及び関節炎において重要な役割を果たす (Reponen, P. 他 (1995) *Dev. Dyn.* 202:388396; Firestein, G.S. (1992) *Curr. Opin. Rheumatol.* 4:348354; Ray, J.M. 及び W.G. Stetler-Stevenson (1994) *Eur. Respir. J.* 7:20622072; Mignatti, P. 及び D.B. Rifkin (1993) *Physiol. Rev.* 73:161195)。別の例は、脂質合成に又はエネルギー生成に用いる酢酸を活性化するアセチルCoA合成酵素である (Luong, A. 他 (2000) *J. Biol. Chem.* 275:26458-26466)。アセチルCoA合成酵素が活性化されると、酢酸とCoAからアセチルCoAが形成される。アセチルCoA合成酵素は、AMP結合ドメインシグネチャとして同定される或る配列類似性領域を共有する。アセチルCoA合成酵素は高血圧と関連性があることが示されている (H. Toh (1991) *Protein Seq. Data Anal.* 4:111-117; 及び Iwai, N. 他 (1994) *Hypertension* 23:375-380)。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

多くの異性化酵素は、タンパク質の折りたたみ、光伝達、及び種々のタンパク質同化経路や異化経路における諸段階を触媒する。或るクラスの異性化酵素は、ペプチジル - プロリルシス - トランス異性化酵素 (PPIアーゼ) として知られる。PPIアーゼ類は、タンパク質内の特定のプロリンイミド結合の、シスからトランスへの異性化を触媒する。PPIアーゼの2つのファミリーが、FK506結合タンパク質 (FKBP) とシクロフィリン (CyP) である。FKBP類が、共に強力な免疫抑制薬であるFK506とラパマイシンとに結合することにより、T細胞内の複数のシグナル伝達経路が抑制される。特に、FKBPのPPIアーゼ活性は、FK506或いはラパマイシンの結合によって阻害される。算出した分子量にしたがって名付けたFKBPファミリーの5つのメンバー (FKBP12、FKBP13、FKBP25、FKBP52及びFKBP65) があり、それらは、様々なタンパク質複合体に関連する、細胞の様々な領域に局在している (Coss, M. 他 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:29336-29341; Schreiber, S.L. (1991) *Science* 251:283-287)。

【 0 0 2 3 】

CyPのペプチジル - プロリル異性化酵素活性は、T細胞活性化につながるシグナル伝達経路の一部である可能性がある。CyP異性化酵素活性はタンパク質折りたたみ及びタンパク質輸送に関連しており、またタンパク質複合体のアセンブリ又は分解、及びタンパク質活性の調節にも関与している可能性がある。例えば、ショウジョウバエにおいてCyP Nina Aはロドプシンの正確な局在化に必要であり、哺乳類のCyP (Cyp40) はステロイド受容体に結合するHsp90/Hsc70複合体の一部である。哺乳類CypAはヒト免疫不全ウイルス1 (HIV-1) からのgagタンパク質と結合するが、この相互作用はシクロスポリンによって抑制し得ることが示されている。シクロスポリンは強力な抗HIV-1活性を有するので、CypAはHIV-1の複製において重要な機能を果たし得る。最後に、Cyp40は転写因子c-Mybに結合し、これを不活化することが示されているが、この作用はシクロスポリンによって逆転される。この作用は、転写、形質転換及び分化の調節でのCyp類の関与を意味する (Bergsma, D.J. 他 (1991) *J. Biol. Chem.* 266:23204 -23214; Hunter, T. (1998) *Cell* 92: 141-143; Levenson, J.D. 及び Ness, S.A. (1998) *Mol. Cell.* 1:203-211)。

【 0 0 2 4 】

プロリンリッチ - カルボキシグルタミン酸 (Gla) タンパク質 (PRGP) 類は、ビタミンK依存性1回貫通型膜内在性タンパク質ファミリーのメンバーである。PRGPタンパク質はGlaリッチなほぼ45アミノ酸の細胞外アミノ末端ドメインを特徴とする。細胞内カルボキシル末端領域には配列PPXYの1つ又は2つのコピーがあり、この配列PPXYはシグナル伝達、細胞周期進行、及びタンパク質代謝回転のような、細胞の多様な機能に関与する種々のタンパク質に存在するモチーフである (Kulman, J.D. 他. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA* 98:1370-1375)。Glaを形成するグルタミン酸残基の翻訳後修飾過程は、ビタミンK依存

性のカルボキシル化である。Glaを含むタンパク質としては、血液凝固に関与する血漿タンパク質類がある。これらのタンパク質とは、プロトロンビン、タンパク質C、S及びZ、並びに血液凝固第VII因子、第IX因子及び第X因子である。オステオカルシン(骨-Glaタンパク質、BGP)及びマトリックスGlaタンパク質(MGP)もまた、Glaを含む(Friedman, P.A.及びC.T. Przysiecki (1987) *Int. J. Biochem.* 19:1-7、Vermeer, C. (1990) *Biochem. J.* 266:625-636)。

【0025】

免疫グロブリン

抗原認識分子群は、すべての脊椎動物が、ウイルス、細菌、真菌及び寄生虫による感染を防ぐために発達させてきた高度且つ複雑な免疫系において重要な役割を果たす。免疫系の主な特徴は、「自己」分子と外来分子すなわち抗原とを区別する能力である。この能力は、リンパ球、顆粒球及び単球のような白血球によって発現される分泌タンパク質及び膜貫通タンパク質によって主に媒介される。これらのタンパク質の多くは、保存された構造ドメインの1つ以上のリピートを持つメンバーたる免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属する。このIgドメインは、Igフォールド(折りたたみ)と呼ばれる或る配列でのジスルフィド結合によって接合されている、逆平行のシート群から構成されている。タンパク質がIgスーパーファミリーのメンバーであるための基準は、1つ以上のIgドメインを持ち、それが70~110アミノ酸残基の長さの領域であり、Ig可変領域様(V)ドメイン又はIg定常領域様(C)ドメインと相同であることである。Igスーパーファミリーのメンバーには抗体(Ab)、T細胞受容体(TCR)、クラスI及びIIの主要組織適合性(MHC)タンパク質、及び免疫細胞特異的表面マーカー群(例えば、「分化クラスター」抗原すなわちCD抗原、CD2、CD3、CD4、CD8、ポリIg受容体、Fc受容体、神経細胞接着分子(NCAM)及び血小板由来成長因子受容体(PDGFR))が含まれる。

10

20

30

40

50

【0026】

Igドメイン(V及びC)は、ポリペプチドに免疫グロブリン(又は抗体)フォールド(折畳み)と呼ばれる球状三次構造を与える保存されたアミノ酸残基の領域である。この免疫グロブリン(又は抗体)フォールドはほぼ平行になった2層のシートからなる。保存的なシステイン残基が、55~75アミノ酸残基の長さをもつ、鎖内ジスルフィド結合ループを形成し、これがこれらシートの2層を接続する。各シートは、3又は4本の逆平行ストランドを持ち、各ストランドは5~10アミノ酸残基の長さである。ストランド群内のアミノ酸残基の疎水性及び親水性の相互作用がIgフォールドを安定させる(疎水性領域はストランドの内向きに面しているアミノ酸残基にあり、親水性領域は外向きに面している部分のアミノ酸残基にある)。VドメインはCドメインより長いポリペプチドで構成され、Igフォールド内に、付加的な1対のストランドを持つ。

【0027】

Igスーパーファミリー遺伝子の一貫した特徴は、あるIgドメインの各配列が1つのエキソンによってコードされることである。Igスーパーファミリーは、細胞間相互作用の仲介に関与する1つのIgドメインをコードする遺伝子から進化した可能性がある。そしてスーパーファミリーの新たなメンバーは、エキソン及び遺伝子の複製によって生じた。現代のIgスーパーファミリータンパク質は、異なる数のVドメイン及び/又はCドメインを有する。このスーパーファミリーの進化上の別の特徴は、DNAの再編成を起こす能力である。これは独自の機能で、ファミリーの抗原受容体メンバーが保持している。

【0028】

Igスーパーファミリーのメンバーの多くは膜内在性の形質膜タンパク質であり、細胞外Igドメインを持つ。それらの膜貫通ドメイン及びそれらの細胞質内尾部の疎水性アミノ酸残基は非常に多様で、Igファミリーのメンバー内又は既知のシグナル伝達をする構造との相同性は少ないか又は欠いている。スーパーファミリーに関するこの一般的な記述には例外がいくつかある。例えば、PDGFRの細胞質内尾部は、チロシンキナーゼ活性を持つ。また、Thy-1は、胸腺細胞及びT細胞で見られる糖タンパク質である。このタンパク質は細胞質内尾部を持たないが、その代わりに原形質膜に共有結合によるグリコシルホスフ

ァチジルイノシトール結合で固着している。

【0029】

Igスーパーファミリータンパク質の多くはまた、これらの分子の機能に必須の、Igドメイン間の相互作用という別の共通の特徴を持っている。多量体タンパク質のIgドメイン間の相互作用には、同種親和性のものと異種親和性（すなわち、同じIgドメイン間の作用、又は異なるIgドメイン間の作用）のものがある。抗体は多量体タンパク質であり、Igドメイン間の同種親和性と異種親和性の双方の相互作用を持つ。重鎖の定常領域の対が抗体のFc領域を形成し、軽鎖及び重鎖の可変領域の対が抗体の抗原結合部位を形成する。異種親和性の相互作用はまた、異なる分子のIgドメイン間でも起こる。これらの相互作用は免疫系における、又は発生中及び成熟した神経系における重要な細胞間相互作用のための細胞間の接着を提供する（Abbas, A.K. 他（1991）Cellular and Molecular Immunology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 142-145ページ）

10

【0030】

抗体

MHCタンパク質群は、外来抗原に結合し、これらをT細胞に提示する細胞表面マーカーである。MHC分子はクラスI又はIIのどちらかに分類される。クラスIのMHC分子(MHC I)はほとんどすべての細胞表面に発現され、またキラーT細胞に対する抗原の提示に関与する。例えば、ウイルスに感染した細胞は細胞内ウイルスタンパク質を分解し、細胞表面のMHC I分子に結合したタンパク質断片を表現する。MHC I/抗原複合体は、感染した細胞とその中のウイルスを破壊するキラーT細胞によって認識される。クラスII MHC分子はB細胞及びマクロファージのような免疫系の分化した抗原提示細胞で主に発現する。これらの細胞は細胞外液から外来タンパク質を取り込み、細胞表面にMHC II/抗原複合体を発現する。この複合体はヘルパーT細胞を活性化し、次にヘルパーT細胞が、免疫反応を刺激するサイトカイン及び他の因子を分泌する。MHC分子はまた、臓器移植後の臓器拒絶反応において重要な役割を果たす。拒絶反応は、移植受容者のT細胞群が、移植された臓器の外来MHC分子群に対し、外来抗原に結合した自己MHC分子群に対するのと同様の応答をする場合に発生する（Alberts, 前出, 1229-1246ページに概説されている）。

20

【0031】

抗体はIgスーパーファミリーの多量体メンバーであり、B細胞の表面で発現されるか、又は、B細胞によって分泌されて血液循環に入る。抗体は、血液中や他の細胞外液中で外来抗原に結合し、それらを中和する。プロトタイプの抗体は、ジスルフィド結合によって連結された2つの同じポリペプチド重鎖（H鎖）と2つの同じポリペプチド軽鎖（L鎖）からなる四量体である。この配列は、抗体分子に対して特徴的なY型を形成する。抗体はH鎖組成に基づいて分類される。抗体の5つのクラスであるIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMは、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ のH鎖型によって定義される。L鎖には κ と λ の2つのタイプがあり、どちらも、対としていずれかのH鎖対に会合し得る。血液循環中に見られる抗体の最も一般的なクラスであるIgGは四量体であるが、抗体の他のクラスのものは一般にこの基本的構造の変異体か、又は多量体である。

30

【0032】

H鎖とL鎖は各々、N末端可変領域とC末端定常領域を有する。定常領域はL鎖の約110のアミノ酸と、H鎖の約330又は440のアミノ酸から構成される。定常領域のアミノ酸配列は、或る特定クラスのH鎖又はL鎖群の内では、ほぼ同一である。可変領域は約110のアミノ酸からなり、H鎖とL鎖の両方にある。しかし、可変領域のアミノ酸配列は、特定クラスのH鎖又はL鎖群の中でも異なる。H鎖又はL鎖の可変領域のそれぞれに、広範な配列多様性を持つ3つの高頻度可変領域があり、各々約5～10のアミノ酸からなる。抗体分子において、H鎖及びL鎖の高頻度可変領域は1つになり、抗原認識部位を形成する（前出のAlberts, B. 他1206-1213ページと1216-1217ページの概説を参照）。

40

【0033】

H鎖とL鎖は共に、Igスーパーファミリーのメンバーの、反復したIgドメインを含む

50

。例えば、典型的なH鎖は4つのIgドメインを含んでおり、そのうちの3つは定常領域内に発生し、1つは可変領域内に発生して抗原認識部位の形成に寄与している。同様にして、典型的なL鎖は2つのIgドメインを含み、そのうちの1つは定常領域内に発生し、他の1つは可変領域内に発生する。

【0034】

免疫系は体内に入る外来分子を認識し、それに応答する能力を持っている。したがって、免疫系はすべての可能性のある抗原に対する抗体の完全な蓄積で武装していなければならない。このような抗体の多様性は、可変領域と定常領域とをコードする遺伝子セグメント群の体細胞性再配列によって作られる。これらの遺伝子セグメント群は、各々の遺伝子セグメントが隣接する高度に保存されたDNA配列間で生じる、部位特異的組換えによって連結されている。何百という異なった遺伝子セグメントがあるため、何百万という独自の遺伝子が、組み合わせにより作成され得る。その上、これらのセグメントの不正確な連結とこれらのセグメント内での異常に高頻度の体細胞性突然変異が、多様な抗体集団の産生に更に寄与している。

10

【0035】

発現プロファイル作成

マイクロアレイは、生物分析に用いる分析ツールである。マイクロアレイには複数の分子を有し、それらは或る固体支持体の表面で空間的に分布し、その表面と安定して結合している。ポリペプチド、ポリヌクレオチド、及び/又は抗体のマイクロアレイが開発され、その種々の用途には例えば遺伝子配列決定、遺伝子発現モニタリング、遺伝子マッピング、細菌同定、創薬、コンビナトリアルケミストリがある。

20

【0036】

特にマイクロアレイを用いる領域は遺伝子発現分析である。アレイ技術は、単一の多型遺伝子の発現や、多数の関連遺伝子又は無関係の遺伝子の発現プロファイルを探求する簡単な方法を提供し得る。単一遺伝子の発現を試験するときは、アレイを用いて或る特定遺伝子又はその変異体の発現を検出する。発現プロファイルを試験するときは、アレイは次のような遺伝子を同定するプラットフォームを提供する。即ちどの遺伝子が組織特異的か、毒性アッセイにおいてテストされる物質に影響されるか、シグナル伝達カスケードの一部であるか、ハウスキーピング機能を実行するか、又は、特定の遺伝的素因や、条件、疾患、又は障害に、特異的に関連する遺伝子であるかの同定である。

30

【0037】

腫瘍細胞群は、腫瘍成長に重要な種々のメディエータ、例えば成長因子、サイトカイン、及びプロテアーゼを分泌する間質の形成を刺激する。EGF、TGF、FGF、IGF及びエストロゲンなどの種々の成長因子は個々に、また協同的に働いて*in vitro*で前立腺上皮細胞の増殖を刺激し、また*in vivo*で上皮細胞の成長に関与する。管及び小葉の内層の管腔前立腺上皮細胞は前立腺癌を起こす主要な細胞である。前悪性上皮細胞から腫瘍細胞への発展は、一部には上述の成長因子によって制御される。

【0038】

II型インターフェロン又は免疫インターフェロンとも呼ばれるインターフェロン (IFN- γ) は、G1中期に或るブロックを確立することによって正常ヒト乳腺上皮細胞での成長停止を誘発するサイトカインである。IFN- γ は24時間以内にcdk2、cdk4及びcdk6のキナーゼ活性を阻害する。IFN- γ の仲介による成長抑制には転写活性化因子(signal transducers and activators of transcription: STAT)-1の活性化が必要であり、またサイクリン依存性キナーゼインヒビターp21の誘導が必要であり得る。IFN- γ はおそらくカスパーゼ-8のレベルの上昇によって、死受容体媒介の、ミトコンドリアの作動によるアポトーシスにヒト腫瘍細胞をかかりやすくする。IFN- γ は主にT-リンパ球とナチュラルキラー細胞によって産生される。IFN- γ はサイトカインの産生を誘発し、クラスIとIIのMHC抗原、Fc受容体及び白血球接着分子の発現を上方制御する。これはマクロファージのエフェクター機能を変調し、アイソタイプの切り替えに影響を与え、B細胞による免疫グロブリンの分泌を増強する。IFN- γ はまた、TH1細胞の拡大を増強し、TH1細胞の分化に必要であり得る

40

50

。IFN- 受容体は、最近クローンされたIL-10受容体に構造的に関連している。IFN- 受容体は成熟赤血球を除くほとんどすべての細胞タイプ上に存在する。

【0039】

腫瘍成長因子 (TGF-)は、安定な多機能性ポリペプチド成長因子である。このタンパク質に特異的な受容体はほとんどすべての哺乳類細胞タイプに存在しているが、分子の作用は細胞タイプや成長の条件によって異なる。一般に、TGF- は間葉起源の細胞に刺激性であり、上皮起源又は神経外胚葉起源の細胞に抑制的である。TGF- はヒト血小板及び哺乳類骨に最も高い濃度で存在することがわかっている。

【0040】

アルツハイマー病(AD)は進行性痴呆であり、神経病理学的な特徴は、アミロイド ペプチドを含むプラークの存在と、特定の脳領域における神経原線維変化である。更に、ニューロンとシナプスは失われ、炎症反応は小膠細胞と星状細胞において活性化する。軽度、中等度及び重症のアルツハイマー病症例の遺伝子発現プロファイル作成は機能喪失に關与する分子機構を明確にするのに役立つであろう。

10

【0041】

乳癌は米国婦人の最も頻繁に診断される癌のタイプであり、二番目に頻度の高い癌死亡の原因となっている。乳癌を発症した米国婦人中、8人に1人に生涯再発の危険があり、乳癌と診断された婦人の三分の一がその疾患で死亡している。ホルモン因子や遺伝因子など幾つかの危険因子が同定されている。多くの研究が乳癌細胞に発生する遺伝子異常の同定に重点を置いている。最も一般的遺伝子欠損は複数の遺伝子座におけるヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity: LOH)を来す。これらの研究から同定化された遺伝子のいくつかはp53、Rb、BRCA1及びBRCA2である。二番目に最も一般的な遺伝的欠陥は遺伝子増幅である。c-myc と c-erbB2 (Her2-neu 遺伝子)は乳癌で増幅される二つの遺伝子として同定され、乳房腫瘍の25-30%がこれらの遺伝子のどちらか一つの増幅を含むステロイド及び成長因子経路、特にエストロゲン、プロゲステロン及び表皮成長因子(EGF)経路もまた乳癌では変異される。前述の遺伝子の各々が複数の下流の標的の転写調節に影響するため、正常乳房組織と癌性乳房組織の間に遺伝子発現パターンにおける種々の相違が存在することが期待される。下流標的の、癌性乳房組織における変異した遺伝子を同定することにより、乳癌を生じる分子経路のより深い理解が得られるであろう。

20

【0042】

乳房腫瘍の組織学的及び分子的評価が示しているところでは、乳癌の発達の進展が経る多段階プロセスにおいて、悪性前の乳腺上皮細胞は、腫瘍形成に導く比較的確定した一連の事象を経験する。早期の腫瘍発達イベントとして導管過形成がある。急速な新生物成長中の細胞は次第に浸潤性の癌に進行し、肺、骨、そして潜在的には他の臓器へ転移するようになる。腫瘍進行と悪性転換との過程に遺伝因子、環境因子、成長因子、及びホルモンなどのいくつかの因子が関与する。この過程の複雑さに基づいて、悪性転換の過程を受けるヒト乳腺上皮細胞集団を研究し、特定進行段階と、表現型と分子との特徴を関連付けることが重要である。

30

【0043】

BT20は74歳の女性から単離された腫瘍塊の薄切片から遊出した細胞から *in vitro*で得られた乳癌細胞株である。

40

【0044】

BT-474は60才の女性から得た乳房の実質性で浸潤性の管癌から単離された乳房腺管癌細胞株である。BT-474はデスモソーム、微絨毛、ギャップ結合及び密着結合のような典型的上皮細胞構造を示す。この細胞株はまた識別可能な微小管、張原線維束(tonofibrils)、リソソーム及びオスミウム親和性分泌性顆粒をも有する。

【0045】

BT-483は23才の女性(乳ガンの家族歴があり、月経のある、正常な経産婦)から得た乳頭の浸潤性乳管腫瘍から単離された乳房腺管癌細胞株である。BT-483はデスモソーム、微絨毛、密着結合及びギャップ結合のような上皮細胞構造の特徴を示す。

50

【 0 0 4 6 】

Hs578Tは74才の乳癌患者(女性)から単離された乳房腺管癌細胞株である。これらの細胞は検出可能なエストロゲン受容体を発現しないし、半流動性培地においてコロニーを形成しない。

【 0 0 4 7 】

MCF7 は或る69才の女性の胸水から単離された非悪性乳腺癌細胞株である。MCF7 は、乳腺上皮の特徴、例えば細胞質エストロゲン受容体を介してエストラジオールをプロセスする能力、及び、培養でドームを形成する能力などを保持している。

【 0 0 4 8 】

MCF10Aは乳腺(腔管の特徴: luminal ductal characteristics)細胞株であり、乳腺症(fibrocystic breast disease)の36才の女性から単離された。MCF-10A は、細胞質ケラチン類、上皮性シアロムチン類、及び乳脂肪小球(milkfat globule)抗原類を発現する。この細胞株はまたコラーゲン中で3次元成長を示し、またコンフルエントな培養でドームを形成する。

【 0 0 4 9 】

MDA-MB-468は51才の乳房の転移性腺癌の女性の胸水から単離された乳房腺癌細胞株である。

【 0 0 5 0 】

大抵の腫瘍と同様、前立腺癌は多段階の進行を通して発達して、最終的に攻撃的腫瘍の表現型をもたらす。腫瘍進行の初めの段階には、正常な内腔及び/又は基底上皮細胞の過剰増殖が関係する。アンドロゲン応答性細胞は過形成し、初期段階の腫瘍に発展する。初期段階の腫瘍はしばしばアンドロゲンに対して感受性がありアンドロゲン除去療法に反応するが、アンドロゲン非依存性細胞の集団は過形成集団から発展する。これらの細胞は侵襲性となり、また骨、脳、又は肺に転移性になり得る前立腺腫瘍のより進んだ形態を表す。

【 0 0 5 1 】

PrECは正常ドナーから単離された初代の前立腺上皮細胞株である。

【 0 0 5 2 】

DU145は、広範囲な転移性の前立腺癌の69才男性の脳の転移部位から単離された前立腺癌細胞株である。DU 145には検出可能なホルモン感受性がなく、半固形培地でコロニーを形成する。そして酸性ホスファターゼに対してほんの弱陽性であり、細胞は前立腺特異抗原(PSA)に対して陰性である

LNCaPは、転移性前立腺癌の50才男子のリンパ節生検から単離された前立腺癌細胞株である。LNCaP細胞は前立腺特異抗原を発現し、前立腺酸性フォスファターゼを産生し、そしてアンドロゲン受容体を発現する。

【 0 0 5 3 】

PC-3はグレード4の前立腺癌の62才男性の骨の転移部位から単離された前立腺癌細胞株である。

【 0 0 5 4 】

遺伝子発現プロファイル作成の潜在的応用は、卵巣癌や骨癌のような癌の診断、予後、及び治療の向上に特に関連している。卵巣癌は婦人科癌の死亡の主な原因となっている。卵巣癌の主なものは上皮細胞から由来しており、上皮卵巣癌の患者の70%は疾患の後期段階にある。その結果、この疾患に対する長期的生存率は極めて低い。卵巣癌の早期マーカーを同定できれば、生存率を大きく増加できるであろう。卵巣癌につながる分子的現象は十分理解されていない。わかっている異常のいくつかにはp53の突然変異とミクロサテライトの不安定性がある骨肉腫は小児の最も一般的な悪性骨腫瘍である。現在用いることのできる治療法では、非転移性疾患のほぼ30~40%の患者が治療後に再発する。初期診断時に、どの患者が再発のリスクが高いかを予測するために用いられ得る予後因子は現在のところ存在しない。非転移性骨肉腫患者における結果を予測できる、唯一の有意な予後因子は、最終的手術の時に切除された原発腫瘍の組織病理学的応答である。

【 0 0 5 5 】

遺伝子発現プロファイル作成の潜在的応用は、また疾患の、診断、予後診断、及び治療の向上にも関わる。疾患の経過に影響する一つの因子、従ってその診断、予後診断及び治療は年齢である。例えば、老化は、腫瘍抑制の正常な機構であり、細胞増殖を制限し、生物を癌から保護するように進化した恒常性を保つ機構である。最も正常なヒト細胞の増殖的寿命は、理想的増殖条件においてさえも、前もってセットされた数の細胞分割の後に細胞分裂周期の停止を誘発する内因性の抑制的シグナルによって制限され、これは「分裂老化 (replicative senescence)」と呼ばれるプロセスである。分裂老化細胞において観察される多数の分子変化は老化過程において体細胞において発生する。分裂老化の遺伝研究によって、腫瘍抑制機構の制御が示された。細胞老化及び他の腫瘍形成を抑制する他の機構によって伝えられる癌からの保護にもかかわらず、哺乳類が老化すると癌が発生することはほとんど不可避である。

10

【 0 0 5 6 】

当分野には、細胞増殖異常、自己免疫/炎症疾患、心血管疾患、神経疾患及び発達障害の、診断、予防、及び治療のための、核酸とタンパク質とを含む新規組成の必要性がある。

【 発明の開示 】

【 発明の効果 】

【 0 0 5 7 】

本発明の種々の実施態様は、総称して「SECP」、個別にはそれぞれ「SECP-1」、「SECP-2」、「SECP-3」、「SECP-4」、「SECP-5」、「SECP-6」、「SECP-7」、「SECP-8」、「SECP-9」、「SECP-10」、「SECP-11」、「SECP-12」、「SECP-13」、「SECP-14」、「SECP-15」、「SECP-16」、「SECP-17」、「SECP-18」、「SECP-19」、「SECP-20」、「SECP-21」、「SECP-22」、「SECP-23」、「SECP-24」、「SECP-25」、「SECP-26」、「SECP-27」、「SECP-28」、「SECP-29」、「SECP-30」、「SECP-31」及び「SECP-32」と呼ぶ精製されたポリペプチドである細胞外メッセンジャーを提供し、またこれらタンパク質とそれらをコードするポリヌクレオチドとを用いる、疾患と病状との、検出、診断、及び治療の方法を提供する。幾つかの実施態様はまた、精製した分泌タンパク質群、並びに/又はそれらをコードするポリヌクレオチドを用いて創薬過程を促進する方法、例えば効力、用量、毒性、及び薬理の決定の方法を提供する。関連する幾つかの実施態様は、精製した分泌タンパク質群、並びに/又はそれらをコードするポリヌクレオチドを用いて疾患と病状との病原を調査する方法を提供する。

20

30

【 0 0 5 8 】

或る実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択されたアミノ酸配列を持つポリペプチドと、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択されたアミノ酸配列と90%以上同一である或いは少なくとも約90%同一である天然アミノ酸配列を持つポリペプチドと、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片と、(d)SEQ ID NO:1-32とからなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、とで構成される群から選択された単離したポリペプチドを提供する。別の実施態様は、SEQ ID NO:1-32のアミノ酸配列を持つ単離したポリペプチドを提供する。

40

【 0 0 5 9 】

また別の実施態様は(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を持つ或る天然アミノ酸配列を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、又は(d)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリヌクレオチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、該ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌク

50

レオチドはSEQ ID NO:33-64からなる群から選択される。

【0060】

また別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモーター配列を持つ組換えポリヌクレオチドを提供する。別の実施態様は、この組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。更に別の実施態様は、この組換えポリヌクレオチドを持つ遺伝形質転換生物を提供する。

10

【0061】

別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドと、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%以上の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチドと、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片と、(d)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、とからなる群から選択したポリペプチドを製造する一方法を提供する。製造方法は、(a)或る細胞を該ポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、この細胞を組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換する過程と、(b)そのように発現したポリペプチドを回収する過程からなる。この組換えポリヌクレオチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対し機能的に連結したプロモーター配列を持つ。

20

【0062】

更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドに特異結合する、単離された抗体を提供する。

30

【0063】

また更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド、及び(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択した、単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施態様で該ポリヌクレオチドは、少なくとも約20、30、40、60、80、又は100の連続したヌクレオチド群からなる場合がある。

【0064】

また別の実施態様は、サンプル中に標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって該標的ポリヌクレオチドが(a)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド、及び(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択される方法を提供する。検出方法は、(a)サンプル中の上記標的ポリヌクレオチドに相補的な或る配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなる或るプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b)該ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出する過程からなる。該プローブと該標的ポリヌクレオチド或いはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは、該標的ポリヌクレオチド

40

50

に対し特異的にハイブリダイズする。或る関連した実施態様で本法は、該ハイブリダイゼーション複合体の量の検出を含みうる。また別の実施態様で該プローブは、少なくとも約20、30、40、60、80、又は100の連続したヌクレオチド群からなる場合がある。

【0065】

また更に別の実施態様は、サンプル中に標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって該標的ポリヌクレオチドが(a)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(b)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する或る天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド、及び(e)(a)~(d)のRNA等価物、からなる群から選択される方法を提

10

【0066】

別の実施態様は、或る有効量のポリペプチドと薬物として許容し得る或る賦形剤とからなる、或る組成物を提供する。有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つ

20

【0067】

また別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、及び

30

【0068】

また更に別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択したポリペプチドのアнтаゴニストとしての有効性を確認するために、或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドを有するサンプルを或る化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程からなる。別の実施態様は、この方法で同定したアンタゴニスト化合物と許容される医薬用賦形剤とを有する、或る組成物を提供する。また別の実施態様は、機能的SECPの過剰発現を伴う疾患や症状の治療を要する患者への、該組成

40

50

物の投与方法を提供する。

【0069】

別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列に少なくとも90%同一である或いは少なくとも約90%同一である天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、又は(d)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択されたポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、(b)試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによって、該ポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

10

【0070】

また別の実施態様は、(a)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチド、(b)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択したアミノ酸配列との少なくとも90%又は少なくとも約90%の同一性を有する或る天然アミノ酸配列を持つポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの生物学的活性断片、及び(d)SEQ ID NO:1-32からなる群から選択した或るアミノ酸配列を持つポリペプチドの免疫原性断片、からなる群から選択した或るポリペプチドの活性をモジュレートする或る化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)該ポリペプチドの活性にとり許容し得る条件下で、該ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合する過程と、(b)該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の存在下で算定する過程と、(c)この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性をこの試験化合物の不存在下での該ポリペプチドの活性と比較する過程からなり、この試験化合物の存在下での該ポリペプチドの活性の変化は、該ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物を標示する。

20

【0071】

また更に別の実施態様は、SEQ ID NO:33-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つ標的ポリヌクレオチドの発現を改変する効果に関し、或る化合物をスクリーニングする一方法を提供する。この方法は、(a)この標的ポリヌクレオチドを有するサンプルを或る化合物に曝露する過程と、(b)この標的ポリヌクレオチドの発現の改変を検出する過程と、(c)可変量のこの化合物の存在下でのこの標的ポリヌクレオチドの発現と、この化合物の不在下での発現とを比較する過程とからなる。

30

【0072】

別の実施態様は、試験化合物の毒性の算定方法を提供する。この方法には、以下の過程がある。(a)核酸群を有する生体サンプルを試験化合物で処理する過程。(b)処理済み生体サンプルの核酸群をハイブリダイズする過程。この過程には、次のようなプローブを用いる。(i)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(ii)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii)(i)に相補的な配列を持つポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物、からなる群から選択した或るポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなるプローブである。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生体サンプル中の標的ポリヌクレオチドとの間に特異的ハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で生じる。上記標的ポリヌクレオチドは、(i)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(ii)SEQ ID NO:33-64からなる群から選択した或るポリヌクレオチド配列との少なくとも90%又は少なくとも約90%の同一性を有する天然ポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド、(iii)(i)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRN

40

50

A等価物、からなる群から選択する。或いは標的ポリヌクレオチドは、上記(i)~(v)からなる群から選択したポリヌクレオチド配列の断片を持つ場合がある。毒性の算定方法には更に、以下の過程がある。(c)ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d)処理済み生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程である。処理済み生体サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量の差異が、試験化合物の毒性を示す。

【0073】

(本発明の記載について)

本発明のタンパク質、核酸、及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明の実施態様が限定されるものではなく、修正され得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施態様を説明する目的で用いたものに過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。

10

【0074】

補足請求及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のもを指す場合もあることに注意されたい。したがって、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には1個以上の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物などについても言及している。

【0075】

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

20

【0076】

(定義)

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

30

【0077】

用語「アゴニスト」は、SECPの生物学的活性を強化又は模倣する分子を指す。アゴニストとしては、SECPと直接に相互作用、或いはSECPが関与する生物学的経路の各成分に作用してSECPの活性をモジュレートする、タンパク質、核酸、糖質、小分子、又は任意の他の化合物や組成物があり得る。

【0078】

「対立遺伝子変異体/変異配列」は、SECPをコードする、別の形態の遺伝子である。対立遺伝子変異体群は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から生じ得る。また、変容したmRNA群を生じ得る。また、この変異体が生じ得るポリペプチドの構造又は機能は、変容することもしないこともある。或る遺伝子は、その天然型の対立遺伝子変異体を全く持たない場合もあり、1個以上持つこともある。対立遺伝子変異体を生じさせる通常の変異性変化は一般に、ヌクレオチドの自然な欠失、付加又は置換による。これら各種の変化は、単独で或いは他の変化と共に、或る配列内で1回以上、生じ得る。

40

【0079】

SECPをコードする「変容した/改変された」核酸配列としては、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換がありながら、SECPと同じポリペプチド、或いはSECPの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドをもたらす配列もある。この定義には、SECPをコ

50

ードするポリヌクレオチドにとり正常な染色体の遺伝子座ではない位置での、アレル変異配列群との不適合或いは予期しないハイブリダイゼーションを含み、また、SECPをコードするポリヌクレオチドの或る特定オリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多型性をも含む。コードされるタンパク質も「変容する/改変される」ことがあり、また、サイレント変化を生じた結果、機能的に等価なSECPとなるような、アミノ酸残基の欠失、挿入又は置換を持ち得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にSECPの活性が保持される範囲で、残基の、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性、についての1つ以上の類似性に基づいて成され得る。例えば負の荷電アミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正の荷電アミノ酸にはリジン及びアルギニンがありうる。親水性値が近似した極性無電荷側鎖を持つアミノ酸としては、アスパラギンとグルタミン、及びセリンとトレオニンを含みうる。親水性値が近似した無電荷側鎖を持つアミノ酸としては、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、及びフェニルアラニンとチロシンを含みうる。

10

【0080】

用語「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、或いはそれらのいずれかの断片を指し、天然分子又は合成分子を指し得る。ここで「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に関連する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

【0081】

「増幅」は、或る核酸配列の付加的複製物を作製する行為に関する。増幅には、当該分野で公知の、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術又は他の核酸増幅技術を用いうる。

20

【0082】

用語「アンタゴニスト」は、SECPの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子を指す。アンタゴニストとしては、SECPと直接相互作用すること、或いはSECPが関与する生物学的経路の各成分に作用することによってSECPの活性をモジュレートする、抗体などのタンパク質、anticalin、核酸、糖質、小分子、又は任意の他の化合物や組成物があり得る。

【0083】

「抗体」の語は、抗原決定基と結合することができる、無傷の免疫グロブリン分子やその断片、例えばFab₁、F(ab')₂及びFv断片を指す。SECPポリペプチドと結合する抗体は、免疫抗原として、無傷のポリペプチド群を用いて、又は、当該の小ペプチド群を持つ断片群を用いて作製可能である。マウス、ラット、ウサギなどの動物を免疫化するために用いるポリペプチド又はオリゴペプチドの由来は、RNAの翻訳の場合や、又は化学合成があり得る。また、それらは所望により、担体タンパク質に抱合し得る。通常用いられる担体であってペプチドと化学結合する担体の例は、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン、及び、スカシガイのヘモシアニン(KLH)などがある。結合したこのペプチドは、前記動物を免疫化するために用いる。

30

【0084】

「抗原決定基」の語は、特定の抗体と接触する、分子の領域(即ちエピトープ)を指す。タンパク質又はタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、該タンパク質の多数の領域が、抗原決定基(タンパク質の特定の領域又は3次元構造)に特異結合する抗体の産生を誘発し得る。抗原決定基は、或る抗体への結合について、無傷の抗原(すなわち免疫応答を引き出すために用いられる免疫原)と競合し得る。

40

【0085】

用語「アプタマー」は、特定の分子標的に結合する核酸又はオリゴヌクレオチドを指す。アプタマーは*in vitro*での進化プロセスに由来する(例えば、SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichmentの略、試験管内選択法)、米国特許第5,270,163号に記述)。これは、大規模なコンビナトリアルライブラリ群から標的特異的アプタマー配列を選択するプロセスである。アプタマーの組成は二本鎖又は一本鎖であり、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導體又は他のヌクレオチド

50

様分子を含み得る。アプタマーの各ヌクレオチド成分は修飾された糖基を持つことがあり（例えば、リボヌクレオチドの2'-OH基は2'-F又は2'-NH₂によって置換され得る）、これは、ヌクレアーゼへの抵抗性又は血中でのより長い寿命など、所望の特性を向上し得る。アプタマーを他の分子（例えば高分子量キャリア）と抱合させることにより、循環系からのこのアプタマーのクリアランスを遅らせ得る。アプタマーは、たとえば架橋剤の光活性化によって各々の同族リガンドと特異的に架橋させうる（Brody, E.N.及びL. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13）。

【0086】

「intramer」の用語は *in vivo* で発現されるアプタマーを意味する例えば、ワクシニアウイルスに基づく或るRNA発現系を用いて、白血球の細胞質内で特定のRNAアプタマー類が高レベルに発現されている（Blind, M.他(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3606-3610）。

10

【0087】

「スピーゲルマー（spiegelmer）」の語はL-DNA、L-RNAその他の左旋性ヌクレオチド誘導体又はヌクレオチド様分子を含むアプタマーを指す。左旋性ヌクレオチド群を持つアプタマー類は、右旋性ヌクレオチド群を持つ基質に通常は作用する、天然酵素類による分解に耐性がある。

【0088】

用語「アンチセンス」は、或る特定の核酸配列を有するポリヌクレオチドの「センス」（コーディング）鎖との塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス組成物としては、DNAや、RNAや、ペプチド核酸（PNA）や、修飾された主鎖結合たとえばホスホリチオ酸、メチルホスホン酸又はベンジルホスホン酸などを有するオリゴヌクレオチドや、修飾された糖基たとえば2'-メトキシエチル糖又は2'-メトキシエトキシ糖などを有するオリゴヌクレオチドや、或いは修飾された塩基たとえば5-メチルシトシン、2'-デオキシウラシル又は7-デアザ-2'-デオキシグアノシンなどを有するオリゴヌクレオチドがあり得る。アンチセンス分子は、化学合成又は転写など、任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、細胞に導入されると、細胞が産生した天然核酸配列との塩基対を形成し二重鎖を形成して転写又は翻訳を妨害する。「負」又は「マイナス」という表現は、ある参考DNA分子のアンチセンス鎖を意味し、「正」又は「プラス」という表現は、ある参考DNA分子のセンス鎖を意味しうる。

20

30

【0089】

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

【0090】

「相補(的)」又は「相補性」の語は、塩基対形成によってアニーリングする2つの一本鎖核酸の間関係を指す。例えば、配列「5'A-G-T3'」は、相補配列「3'T-C-A5'」と対を形成する。

【0091】

「～のポリヌクレオチドを含む（持つ）組成物」又は「～のポリペプチドを含む（持つ）組成物」は、所定のポリヌクレオチド配列若しくはポリペプチドを持つ、任意の組成物を指す。この組成物には、乾燥製剤又は水溶液が含まれ得る。SECPをコード又はSECPの断片群をコードするポリヌクレオチド群を有する組成物類は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用し得る。これらプローブは、凍結乾燥形態で貯蔵でき、また、糖質などの安定化剤と結合させ得る。ハイブリダイゼーションにおいては、塩（例えばNaCl）、界面活性剤（例えばドデシル硫酸ナトリウム；SDS）及び他の成分（例えばデンハート液、粉乳、サケ精子DNAなど）を有する水溶液中に、プローブを分散させ得る。

40

【0092】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い

50

、XL-PCRキット (PE Biosystems, Foster City CA) を用いて 5' 及び / 又は 3' の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、又は GELVIEW 断片アセンブリシステム (Accelrys, Burlington MA) 又は Phrap (University of Washington, Seattle WA) 等の断片アセンブリ用のコンピュータプログラムを用いて 1 つ或いはそれ以上のオーバーラップする cDNA や EST、又はゲノム DNA 断片からアセンブリされた核酸配列を指す。伸長及びアセンブリの両方を行ってコンセンサス配列を作製する配列もある。

【 0 0 9 3 】

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

10

【 0 0 9 4 】

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

20

30

【 0 0 9 5 】

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

【 0 0 9 6 】

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

40

【 0 0 9 7 】

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

50

セスである。

【0098】

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

【0099】

「差次的発現」は少なくとも2つの異なったサンプルを比較することによって決められる、増加（上方調節）、或いは減少（下方調節）、又は遺伝子発現又はタンパク発現の欠損を指す。このような比較は例えば、処理済サンプルと不処理サンプル、又は病態サンプルと健常サンプルとの間で行われ得る。

【0100】

「エキソンシャフリング」は、異なるコード領域（エキソン）の組換えを意味する。或るエキソンは、コードするタンパク質の1つの構造的又は機能的ドメインを意味し得るため、安定した下部構造群の新たな組み合わせによって新規のタンパク質群をアセンブリすることが可能であり、新たなタンパク質機能の進化を促進できる。

【0101】

用語「断片」は、SECPの又はSECPをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列（parent sequence）と配列は同一であり得るが親配列より長さが短いものを指す。或る断片は、最長で定義された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さを有し得る。例えば或る断片は、約5～約1000の連続したヌクレオチド又はアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の、連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さであり得る。断片は、或る分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、或るポリペプチド断片は、定義された或る配列内に見られるような或るポリペプチドの最初の250又は500アミノ酸（又は最初の25%又は50%）から選択した、或る長さの連続したアミノ酸を持ち得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施態様では、配列表、表及び図面を含む本明細書が支持する任意の長さであり得る。

【0102】

SEQ ID NO:33-64の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:33-64を特異的に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を持ちうる。SEQ ID NO:33-64の或る断片を本発明の方法の1つ以上の実施態様、例えばハイブリダイゼーション及び増幅技術に、又はSEQ ID NO:33-64を関連ポリヌクレオチドから区別する類似の方法に用い得る。SEQ ID NO:33-64の断片の正確な長さ及び断片に対応するSEQ ID NO:33-64の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0103】

SEQ ID NO:1-32の或る断片は、SEQ ID NO:33-64の或る断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-32の或る断片は、SEQ ID NO:1-32を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を持ち得る。例えばSEQ ID NO:1-32の或る断片を、SEQ ID NO:1-32を特異的に認識する抗体の開発における免疫原性ペプチドとして用い得る。SEQ ID NO:1-32の或る断片の正確な長さは、また、この断片に対応するSEQ ID NO:1-32の領域は、その断片に意図する目的に基づき、本明細書に記載する、又は当分野で既知の1つ以上の分析法で判定し得る。

【0104】

「完全長」ポリヌクレオチドとは、少なくとも1つの翻訳開始コドン（例えばメチオニン）と、それに続く1オープンリーディングフレーム及び翻訳終止コドンを有する配列である。或る「完全長」ポリヌクレオチド配列は、或る「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

【0105】

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

10

20

30

40

50

【0106】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」又は「～%同一」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する同一残基の割合を意味する。標準化アルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するため、標準化された再現性のある方法で比較対象の2配列内にギャップ群を挿入し得るので、2つの配列をより有意に比較できる。

【0107】

ポリヌクレオチド配列間の一一致率(同一性)を判定するには、当分野で既知の、又は本明細書に記載の、1つ以上のコンピュータアルゴリズム又はプログラムを用い得る。例えば一致率を判定するには、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムの、デフォルトのパラメータ群を用い得る。このプログラムは、LASERGENEソフトウェアパッケージ(一組の分子生物学的分析プログラム)(DNASTAR, Madison WI)の一部である。CLUSTAL Vは、Higgins, D.G.及びP.M. Sharp (1989; CABIOS 5:151-153)、並びにHiggins, D.G.他(1992; CABIOS 8:189-191)に記載がある。ポリヌクレオチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。

【0108】

或いは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)が、一般的に用いられ且つ入手自由な用い得る配列比較アルゴリズム一式を提供している(Altschul, S.F.他(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。BLASTアルゴリズムは幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列をペアワイズで直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn及びblastp(以下に記載)の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ(gap)などのパラメータをデフォルト設定にセットして用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)を用いてblastnを実行し得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【0109】

Matrix: BLOSUM62
 Reward for match: 1
 Penalty for mismatch: -2
 Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties
 Gap x drop-off: 50
 Expect: 10
 Word Size: 11
 Filter: on

【0110】

一致率は、ある定義された配列の全長(例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列)について測定し得る。或いは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな配列から得られた断片(例えば少なくとも20、30、40、50、70、100又は200の連続したヌクレオチドの断片)の長さについて一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列表を含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

10

20

30

40

50

【0111】

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

【0112】

ポリペプチド配列に用いられる用語「一致率」又は「一致性%」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上のポリペプチド配列間の一致する同じ残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の電荷及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を(したがって機能も)保存する。ポリペプチド配列に用いられる用語「類似率」又は「類似性%」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上のポリペプチド配列間の同じ残基の一致及び保存的置換を含む残基の一致率を意味する。一方、保存的置換は、ポリペプチド配列間の一致率の計算には含まれない。

10

【0113】

ポリペプチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる(既に説明したのでそれを参照されたい)。CLUSTAL Vを用いてポリペプチド配列をペアワイズアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定される。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。

20

【0114】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用い得る。例えば、2つのポリペプチド配列をペアワイズで比較する場合、「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)のblastpをデフォルトパラメータに設定して用い得る。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【0115】

Matrix: BLOSUM62
Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 3
Filter: on

30

【0116】

一致率は、ある定義されたポリペプチド配列の全長(例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列)について測定し得る。或いは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きなポリペプチド配列から得た断片(例えば少なくとも15、20、30、40、50、70、又は150の連続した残基の断片)の長さについて一致率を測定しうる。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列表を含めた本明細書に記載された配列が支持する任意の断片長を用いて、一致率を測定し得る或る長さを説明し得ることを理解されたい。

40

【0117】

「ヒト人工染色体(HAC)」は、約6 kb(キロベース)~10 MbのサイズのDNA配列を含み得る、染色体の複製、分離及び維持に必要な全ての要素を含む直鎖状の微小染色体である。

【0118】

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

【0119】

50

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相補性を共有することの指標である。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、1回以上の「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異結合（すなわち完全には一致しない核酸鎖対間の結合）が減少する。核酸配列のアニーリングに関する許容条件は、当業者が慣例的に決定できる。アニール条件はどのハイブリダイゼーション実験でも一定であり得るが、洗浄条件は、所望のストリンジェンシー、したがってハイブリダイゼーション特異性を得るように、実験ごとに変更し得る。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が68℃で、約6×SSC、約1%（w/v）のSDS、並びに約100µg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

10

【0120】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特定の配列の融点（ T_m ）より約5～20℃低くなるように選択する。この T_m は、所定のイオン強度及びpHの条件下で、完全一致プローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrook, J. 及び D.W. Russell (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor NY, 9章)。

20

【0121】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約0.1%のSDSの存在下で、約68℃で1時間の洗浄過程を含む。別法では、約65℃、60℃、55℃、又は42℃の温度で行う。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約0.1～2×SSCの範囲で変更し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング剤には、例えば、約100～200µg/mlの、せん断した変性サケ精子DNAがある。特定条件下で、例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションでは、有機溶剤、例えば約35～50%v/vの濃度のホルム

30

【0122】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合の形成によって形成された、2つの核酸配列の複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶解状態で形成し得る（ C_0t 又は R_0t 解析など）。或いは、一方の核酸が溶解状態で存在し、もう一方の核酸が固体支持体（例えば紙、膜、フィルター、チップ、ピン又はガラススライド、或いは他の適切な基板であって細胞若しくはその核酸が固定される基板）に固定されてい

40

【0123】

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

【0124】

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

【0125】

50

「免疫原性断片」は、生物（例えば哺乳類）に導入すると免疫応答を引き起こし得る、SECPのポリペプチド断片又はオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」はまた、本明細書で開示する又は当分野で周知のあらゆる抗体生産方法に有用な、SECPの任意のポリペプチド断片又はオリゴペプチド断片をも指す。

【0126】

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

【0127】

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

10

【0128】

用語「モジュレート」又は「活性を調節」は、SECPの活性を変化させることを指す。例えば、モジュレートによって、SECPのタンパク質活性の増減が、或いは、結合特性又はその他の、生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が生じ得る。

【0129】

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

20

【0130】

「機能的に連結した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、或るプロモーターが或るコード配列の転写又は発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に連結している。機能的に連結したDNA配列群は非常に近接するか連続的に隣接することがあり、また、2つのタンパク質コード領域を結合するために必要な場合は同一リーディングフレーム内にあり得る。

【0131】

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

30

【0132】

SECPの「翻訳後修飾」としては、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、タンパク質分解切断、及びその他の当分野で既知の修飾を含み得る。これらのプロセスは、合成的或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、SECPの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なることとなる。

【0133】

「プローブ」とは、同一核酸、対立遺伝子核酸、又は関連核酸の検出に用いる、SECPやそれらの相補配列、又はそれらの断片をコードする核酸を指す。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであって、検出可能な標識又はレポーター分子に接着した配列である。典型的な標識には、放射性同位元素、リガンド、化学発光剤、及び酵素がある。「プライマー」は、短い核酸、通常はDNAオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素により、標的DNA鎖に沿って伸長され得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による、核酸の増幅(及び同定)に用い得る。

40

【0134】

本発明に用いるプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の、少なくとも15の連続したヌクレオチド群からなる。特異性を高めるため、長めのプローブ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、9

50

0、100又は少なくとも150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及びプライマーも用い得る。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。表、図面及び配列表を含む本明細書が支持する、任意の長さのヌクレオチドを用い得るものと理解されたい。

【0135】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J. 及び D.W. Russell (2001; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor NY)、Ausubel, F.M. 他(1999; Short Protocols in Molecular Biology, 第4版, John Wiley & Sons, New York NY), 及び Innis, M. 他 (1990; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CA) などの参照文献に記載がある。PCRプライマー対を既知の配列から得るには、例えば、そのためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA) を用い得る。

10

【0136】

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

20

30

【0137】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグメントを人工的に組み合わせた核酸である。この人為的組み合わせはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばSambrookとRussellの文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部が付加、置換又は欠失により改変された核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に連結した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、例えばある細胞を形質転換するために使用されるベクターの一部と成し得る。

40

【0138】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの一部と成すことができ、ベクター

50

は例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。そのようなベクターは哺乳類に接種され、その組換え核酸が発現されて、その哺乳類内で防御免疫応答を誘導するように使用することができる。

【0139】

「調節因子」は、通常は遺伝子の非翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写、翻訳又はRNA安定性を制御する宿主タンパク質又はウイルスタンパク質と相互作用する。

【0140】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸又は抗体の標識に用いられる化学的又は生化学的な部分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色原体、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。

【0141】

DNA分子に対する「RNA等価物」は、基準となるDNA分子と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、全ての窒素性塩基のチミンがウラシルで置換され、糖鎖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0142】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。SECPをコードする核酸若しくはその断片、又はSECP自体を含む疑いのあるサンプルは、体液や、細胞、染色体、細胞小器官又は細胞から単離された膜からの抽出物や、細胞や、溶解しているか基板に結合しているゲノムDNA、RNA又はcDNAや、組織や、組織プリント等から構成され得る。

【0143】

用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造(例えば抗原決定基すなわちエピトープ)であって結合分子が認識する構造の有無に依存する。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、遊離した標識A及びその抗体を含む反応において、エピトープA(つまり遊離した、標識されていないA)を含むポリペプチドの存在が、抗体に結合する標識されたAの量を低減させる。

【0144】

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

【0145】

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

【0146】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気又は非磁気ビーズ、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。基板は、ウェル、溝、ピン、チャンネル、孔など、様々な表面形態を有することができ、基板表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0147】

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

【0148】

「形質転換(transformation)」とは、外来DNAが受容細胞に導入されるプロセスのことである。形質転換は、当該分野で公知の種々の方法に従って自然条件又は人工条件下で生

10

20

30

40

50

じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核宿主細胞又は真核宿主細胞に挿入する、任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、バクテリオファージ或いはウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された細胞」には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

【0149】

ここで用いる「遺伝形質転換生物体(transgenic organism)」とは任意の生物体であり、限定するものではないが動植物を含み、生物体の1個以上の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られているトランスジェニック(transgenic)技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接又は間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスでの感染によって行う。別の実施態様で核酸の導入は、組換えウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターを感染させて成し得る(Lois, C. 他(2002) Science 295:868-872)。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いは体外受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指す。本発明に基づいて企図される遺伝形質転換生物には、細菌、藍藻、真菌、及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換又はトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookとRussell(前出)などの文献で提供されている。

10

20

【0150】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の配列同一性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体(前述)、「スプライス」変異体、「種」変異体又は「多型性」変異体として記載し得る。スプライス変異体は参照分子との顕著な同一性を有し得るが、mRNAプロセシング中のエキソン群の選択的スプライシングによって通常、より多数又はより少数のヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメイン群を有するか、或いは参照分子には存在するドメイン群が欠落していることがある。種変異体は、種によって異なるポリヌクレオチドである。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互に有意のアミノ酸同一性を持つ。多型変異体は、或る種の個体間における、或る特定遺伝子のポリヌクレオチド配列内での変異である。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1塩基多型性」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば特定の集団、病態又は病態性向を示し得る。

30

【0151】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の配列相同性又は配列類似性を有するポリペプチド配列として定義される。定義づけには、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9(1999年5月7日)を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、そのポリペプチドの一方の所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の配列同一性又は配列類似性を示し得る。

40

【0152】

(発明)

50

本発明の様々な実施様態は、新規のヒト分泌タンパク質（SECP）及び、SECPをコードするポリヌクレオチドに基づく。また、これらの組成物を利用した、細胞増殖異常、自己免疫/炎症性障害、心血管障害、神経系疾患、及び発達障害の、診断、治療、又は予防を含む。

【0153】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド実施態様及びポリペプチド実施態様の命名の概略である。各ポリヌクレオチド及びその対応するポリペプチドは、1つのIncyteプロジェクト識別番号（IncyteプロジェクトID）に相関する。各ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列識別番号（ポリペプチドSEQ ID NO:）とIncyteポリペプチド配列番号（IncyteポリペプチドID）によって表示した。各ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列識別番号（ポリヌクレオチドSEQ ID NO:）とIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号（IncyteポリヌクレオチドID）によって表示した。列6は、本発明のポリペプチド配列とポリヌクレオチド配列とに対応する物理的完全長クローン群のIncyte ID番号を示す。完全長クローンは、列3に示すポリペプチド配列に対して少なくとも95%の配列同一性を持つポリペプチドをコードする。

【0154】

表2は、GenBankタンパク質（genpept）データベースとPROTEOMEデータベースとに対するBLAST分析で同定した、本発明のポリペプチド群に相同な配列群を示す。列1及び列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号（ポリペプチドSEQ ID NO:）と、それに対応するIncyteポリペプチド配列番号（IncyteポリペプチドID）を示す。列3は、最も近いGenBank相同体のGenBank識別番号（GenBank ID NO:）と、最も近いPROTEOMEデータベース相同体のPROTEOMEデータベース識別番号（PROTEOME ID NO:）を示す。列4は、各ポリペプチドとその相同体1つ以上との間の一致に関する確率スコアを示す。列5はGenBank及びPROTEOMEデータベースの相同体の注釈を示し、更に該当箇所には関連する引用文献も示す。これらすべては特にこの参照により開示に含まれる。

【0155】

表3は、本発明のポリペプチドの多様な構造的特徴を示す。列1及び列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号（SEQ ID NO:）と、それに対応するIncyteポリペプチド配列番号（IncyteポリペプチドID）を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4は潜在的リン酸化部位を示し、列5は潜在的グリコシル化部位を示すが、これはGCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム（Accelrys, Burlington MA）によって決定された。列6は、シグネチャ配列、ドメイン、及びモチーフを含むアミノ酸残基を示す。これには、シグナルペプチドの位置（「signal_peptide」及び/又は「signal_cleavage」として示す）を含む。列7はタンパク質の構造/機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所には更に、分析方法に用いた検索可能なデータベースを示す。

【0156】

表2及び3は共に、本発明の各々のポリペプチドの特性を要約しており、それら特性が、請求の範囲に記載されたポリペプチドが分泌タンパク質であることを確立している。例えば、SEQ ID NO:1はトロンボスポンジン1型ドメイン分子である、マウスのR-spondin（GenBank ID g4519541）と88%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool（BLAST）によって示された（表2参照）。BLAST確率スコアは $3.8e-132$ であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:1はまた、1つのトロンボスポンジンタイプ1ドメインをも有するが、これは、隠れマルコフモデル（HMM）を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された（表3参照）。P値は $7.5e-3$ である。SPSCANとHMMER分析からのデータはSEQ ID NO:1が分泌タンパク質であるさらに確証的証拠を提供する。また他の例として、SEQ ID NO:8は、残基M1から残基K147まで、マウスPNG（ホスホリパーゼC 3 隣接遺伝子）（GenBank ID g1478205）と96%同一であることがBasic Local Alignment Search Tool（BLAST）によって示された（表2参照）。B

10

20

30

40

50

LAST確率スコアは $8.4e-73$ であり、これは観測されたポリペプチド配列を偶然に得る確率を示す。SEQ ID NO:8はまた、1つのホスホリパーゼC隣接ドメインを含むことが、BLAST_PRODUM分析によって確認された。SPSCANとHMMER解析からのデータは、SEQ ID NO:8が分泌タンパク質であることを示す更に確証的な証拠を提供する。別の実施例においてSEQ ID NO:20は、残基M1から残基K222までが、ヒトナチュラルキラー細胞転写物4(GenBank ID g14424787)に対して94%同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは $1.6e-119$ であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:20は、細胞接着に關与するRGDモチーフを持つ細胞外タンパク質であり、リンパ球によって発現され、また分裂促進因子活性化T細胞とIL-2で処理されたNK細胞において上方制御されることが、PROTEOMEデータベースを用いたBLAST分析によって確認された(表3参照)。PRODUMデータベースのBLAST解析からのデータは、SEQ ID NO:20がナチュラルキラー細胞タンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。別の例において、SEQ ID NO:28はヒト my050 タンパク質 (GenBank ID g12002046)と残基M1からC121にかけて99%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって決定された(表2参照)。BLAST確率スコアは $1.4e-65$ であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:28はまた、シグナルペプチドをも含むことがSPSCANによって確認された。別の例においてSEQ ID NO:32は、残基M1から残基R832まで、ヒトのロイシンリッチ神経細胞タンパク質(GenBank ID g3135309)に対して99%が同一であると、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)で判定された(表2参照)。BLAST確率スコアは0であり、これは観察されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:32はまた、カルポニドメイン含有ロイシンリッチ神経細胞タンパク質であるタンパク質と相同性を有することがPROTEOMEデータベースを使ったBLAST解析によって示された。SEQ ID NO:32はまた、1つのロイシンリッチリピートドメインを有することが、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された(表3参照)。BLIMPS、BLAST、TMHMMER及びSPSCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO:32が分泌ロイシンリッチ神経細胞タンパク質であるという、さらに確証的な証拠を提供する。SEQ ID NO:2-7、SEQ ID NO:9-19、SEQ ID NO:21-27、及びSEQ ID NO:29-31については、同様の方法で分析し、注釈を付けた。SEQ ID NO:1-32の解析のためのアルゴリズム及びパラメータは表7に記述する。

【0157】

表4に示すように、完全長ポリヌクレオチド実施態様は、cDNA配列又はゲノムDNA由来のコード(エキソン)配列を用いて、或いはこれら2種類の配列を任意に組み合わせてアセンブリした。列1は本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)及び対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte ID)、及び塩基対の各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列2は、完全長ポリヌクレオチド実施態様のアセンブリに使われたcDNA配列及び/又はゲノム配列のヌクレオチド開始位置(5')と停止位置(3')、及びSEQ ID NO:33-64を同定するか、又はSEQ ID NO:33-64と、關連するポリヌクレオチド配列とを区別する技術(例えば、ハイブリダイゼーション技術又は増幅技術)に有用なポリヌクレオチドの断片のヌクレオチド開始位置(5')と終了位置(3')を示す。

【0158】

表4の列2に記載したポリヌクレオチド断片は、特に例えば組織特異的cDNAライブラリ群やプールしたcDNAライブラリ群に由来するIncyte cDNA群を指す場合もある。或いは列2に記載のポリヌクレオチド断片は、完全長ポリヌクレオチドのアセンブリに寄与したGenBank cDNA又はESTを指す場合もある。さらに、列2のポリヌクレオチド断片は、ENSEMBL(The Sanger Centre、英国ケンブリッジ)データベースから由来した配列(即ち「ENST」命名を含む配列)を同定し得る。或いは、列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Records データベースから由来する場合もあり(即ち

「NM」又は「NT」の命名を含む配列)、またNCBI RefSeq Protein Sequence Recordsから由来する場合もある(即ち「NP」の命名を含む配列)。又は列2のポリヌクレオチド断片は、「エキソnstitching(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方のアセンブリ体を意味する場合がある。例えば、FL_XX XXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄ と同定されるポリヌクレオチドは、アルゴリズムが適用される配列のクラスターの識別番号がXXXXXXであり、アルゴリズムにより生成される予測の番号がYYYYYであり、(もし存在すれば)N_{1,2,3...}が解析中に手動で編集された可能性のある特定のエキソンであるような「縫合された(stitched)」配列である(実施例5参照)。又は、列2のポリヌクレオチド断片は「エキソnstretching(exon-stretching)」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンのアセンブリ体を指す場合もある。例えば、FLXXXXX _gAAAAA_gBBBBB_1_Nとして同定されるポリヌクレオチド配列は、「ストレッチされた」配列である。XXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソnstretching」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号又はNCBI RefSeq 識別番号であり、Nは特定のエキソンを指す(実施例5を参照)。あるRefSeq配列が「エキソnstretching」アルゴリズムのためのタンパク質相同体として使用された場合には、RefSeq識別子(「NM」、「NP」、又は「NT」によって表される)が、GenBank識別子(即ち、gBBBBB)の代わりに使用される場合もある。

10

【0159】

或いは、接頭コードは、手動で編集された構成配列、ゲノムDNA配列から予測された構成配列、又は組み合わされた配列解析方法に由来する構成配列を同定する。次の表は、構成配列の接頭コードと、接頭コードに対応する配列分析方法の例を列記する(実施例4と5を参照)。

20

【0160】

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

30

40

【0161】

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

【0162】

表5は、Incyte cDNA配列を用いてアセンブリされた完全長ポリヌクレオチドのための代表的なcDNAライブラリを示している。代表的なcDNAライブラリとはIncyte cDNAライブ

50

ラリであり、これは、最も頻繁にはIncyte cDNA配列群によって代表されるが、これら配列は、上記ポリヌクレオチドをアセンブリ及び確認するために用いられた。cDNAライブラリを作製するために用いた組織及びベクターを表5に示し、表6で説明している。

【0163】

本発明はまた、SECPの変異体も含む。SECPの変異体の種々の実施例は、SECPアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約90%、或いは、少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有し、SECPの機能的又は構造的特徴を少なくとも1つ含む得る。

【0164】

種々の実施態様はまた、SECPをコードするポリヌクレオチドを含む。特定の実施例において、本発明は、SECPをコードするSEQ ID NO:33-64からなる群から選択した配列を含むポリヌクレオチド配列を含む。配列表に示したSEQ ID NO:33-64のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースからなる等価RNA配列を含む。

10

【0165】

本発明はまた、SECPをコードするポリヌクレオチドの変異体群を含む。詳細には、このような変異体ポリヌクレオチドは、SECPをコードするポリヌクレオチドとの、少なくとも約70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも約85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を持つこととなる。本発明の或る実施態様では、SEQ ID NO:33-64からなる群から選択された核酸配列と少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、又は少なくとも約95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するようなSEQ ID NO:33-64からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、SECPの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドをコードし得る。

20

【0166】

さらに、或いは別法では、本発明のポリヌクレオチド変異体は、SECPをコードするポリヌクレオチドのスプライス変異体である。或るスプライス変異体はSECPをコードするポリヌクレオチドとの顕著な配列同一性を持つ部分(複数)を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソン群の選択的スプライシングによって生ずる、配列の数ブロックの付加又は欠失により、通常、より多数又はより少数のポリヌクレオチドを有することになる。或るスプライス変異体には、約70%未満、又は約60%未満、或いは約50%未満のポリヌクレオチド配列同一性が、SECPをコードするポリヌクレオチドとの間で全長に渡って見られるが、このスプライス変異体の幾つかの部分には、SECPをコードするポリヌクレオチドの各部との、少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、又は少なくとも約95%、なお又は100%の、ポリヌクレオチド配列同一性を有することとなる。例えば、SEQ ID NO:36の配列を含むポリヌクレオチド及びSEQ ID NO:37の配列を含むポリヌクレオチドは互いにスプライス変異体であり、またSEQ ID NO:55の配列を含むポリヌクレオチドとSEQ ID NO:59の配列を含むポリヌクレオチドは互いにスプライス変異体である。上記のスプライス変異体は何れも、SECPの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有する或るポリペプチドをコードし得る。

30

【0167】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るSECPをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、自然発生する任意の既知の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組み合わせの選択によって産出し得るあらゆる可能なポリヌクレオチド配列のバリエーションを企図する。これらの組み合わせは、天然のSECPのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られ、全てのそのような変異が明確に開示されているとみなす。

40

【0168】

SECPとその変異体とをコードするポリヌクレオチドは一般に、好適に選択されたストリンジェンシー条件下で天然SECPのポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能であるが、非天

50

然コドン群を含めるなどの実質的に異なるコドン使用を有するSECP或いはその誘導体をコードするポリヌクレオチドを作り出すことは、有益であり得る。宿主が特定コドンを利用する頻度に基づき、特定の真核宿主又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようコドンを選択し得る。コードされたアミノ酸配列を変えないで、SECP及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する他の理由は、天然の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることにある。

【0169】

本発明にはまた、SECP とその誘導体とをコードする、ポリヌクレオチド群又はそれらの断片の、完全に合成化学による作製も含む。作製後、当分野で周知の試薬を用いて、この合成ポリヌクレオチドを任意の様々な入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いてSECP又はその任意の断片をコードする或るポリヌクレオチドに突然変異を誘導し得る。

【0170】

本発明の実施態様には、種々のストリンジェンシー条件下で、請求項に記載のポリヌクレオチド、特に、SEQ ID NO:33-64に示す配列を持つポリヌクレオチド、及びそれらの断片群にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド群が含まれる(Wahl, G.M.及びS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.*152:399-407、Kimmel, A.R.(1987)*Methods Enzymol.*152:507-511)。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載した。

【0171】

DNAシーケンシングの方法は当分野では周知であり、本発明のいずれの実施態様にも、DNAシーケンシング方法を用い得る。DNAシーケンシング方法には酵素を用い得る。例えばDNAポリメラーゼ1のクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham Biosciences, Piscataway NJ) を用い得る。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Invitrogen, Carlsbad CA) において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼとを併用し得る。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Applied Biosystems) などの装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Amersham Biosciences) 又は当分野で周知の他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する (Ausubel 他、前出、第7章; Meyers, R.A. (1995) *Molecular Biology and Biotechnology*, Wiley VCH, New York NY、856-853ページ)。

【0172】

当分野で周知の、PCR法をベースにした種々の方法と、部分的ヌクレオチド配列とを利用して、SECPをコードする核酸を伸長し、プロモーターや調節エレメントなど、上流にある配列を検出し得る。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である (Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic* 2:318-322)。別の方法にインバースPCR法があり、これは多岐の方向に伸長するプライマー群を用いて、環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、或る既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列群からなる制限酵素断片群から得る (Triglia, T.他 (1988) *Nucleic Acids Res.*16:8186)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これにはヒト及び酵母人工染色体DNAの既知の配列群に隣接するDNA断片群をPCR増幅する方法を含む (Lagerstrom, M.他 (1991) *PCR Methods Applic.*1:111119)。この方法では、PCRを行う前に、複数の制限酵素の消化及びライゲーション反応を用い、未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入し得る。未知の配列群を検索するために用い得る、他の複数の方法も当分野で既知である (例えばParker, J.D.他 (1991) *Nucleic Acids Res.*19:30553060)。

【0173】

更に、PCR、ネステッドプライマー類、及びPROMOTERFINDERライブラリ類 (Clontech, Palo Alto CA) を用いて、ゲノムDNAをウォーキングし得る。この手順は、ライブラリ類をスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部の発見に有用である。全てのPCRベースの方法では、市販ソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上で、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするように、プライマー群を設計し得る。

【0174】

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

10

【0175】

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

20

【0176】

本発明の別の実施例では、SECPをコードするポリヌクレオチド又はその断片を組換えDNA分子にクローニングして、適切な宿主細胞内にSECP、その断片又は機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のポリペプチドをコードする別のポリヌクレオチドを産生し、これらの配列をSECPの発現に利用し得る。

【0177】

種々の目的で、SECPをコードする配列群を改変するために、当分野で一般的に既知の複数の方法を用いて、本発明のポリヌクレオチド群を組換えることができる。この組換えの多様な目的には、遺伝子産物のクローニングの、或いはプロセッシング及び/又は発現のモディフィケーションが含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドとの、ランダムな断片化及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組換え得る。例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的変異導入を利用して、新規な制限部位の作製、グリコシル化パターンの改変、コドン選択性の変更、スプライス変異体の生成などを起こす突然変異を導入し得る。

30

【0178】

本発明のヌクレオチドは、MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA, 米国特許第5,837,458号、Chang, C.-C.他(1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他(1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. 他(1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319) などのDNAシャッフリング技術の対象となり得る。これにより、生物活性又は酵素活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力など、SECPの生物学的特性を改変或いは改良し得る。DNAシャッフリングは、PCRを介する遺伝子断片組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。ライブラリはその後、所望の特性を持つ遺伝子変異体群を同定する、選択又はスクリーニングの手順を経る。続いて、これら好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行い得る。従って、「人工的な」育種及び急速な分子の進化によって遺伝的多様性が生み出される。例えば、ランダムな点突然変異を持つ単一の遺伝子の断片を組換えて、スクリーニ

40

50

ングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングし得る。或いは、所定の遺伝子の断片群を同種又は異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子の断片と組換えて、自然に生じる複数遺伝子の遺伝的多様性を、定方向の、制御可能な方法で最大化できる。

【0179】

別の実施態様によれば、SECPをコードするポリヌクレオチドは、当分野で周知の1つ以上の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である(Caruthers, M.H. 他. (1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223; Horn, T.他(1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232)。或いは、SECP 自体又はその断片を当分野で既知の化学的方法を用いて合成し得る。例えば、種々の液相又は固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる(Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY55-60ページ; Roberge, J.Y.他(1995) Science 269:202-204)。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ(Applied Biosystems)を用いて達成し得る。更にSECPのアミノ酸配列又は任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/又は他のタンパク質の配列又は任意のその一部からの配列との組み合わせにより、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチド又は変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

10

【0180】

このペプチドは分取用高速液体クロマトグラフィーで実質的に精製し得る(Chiez, R.M. 及びF.Z. Regnier (1990) Methods Enzymol. 182:392-421)。この合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析又はシーケンシングで確認できる(前出Creighton, 28-53ページ)。

20

【0181】

生物学的に活性なSECPを発現させるために、SECPをコードするポリヌクレオチド又はその誘導体を好適な発現ベクターに挿入し得る。好適な発現ベクターとは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の制御に必要なエレメント群を持つベクターである。必要なエレメントとしては、ベクター内及びSECPをコードするポリヌクレオチドにおける調節配列(例えばエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域など)が含まれる。必要なエレメント群は、強度及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、SECPをコードするポリヌクレオチドのより効果的な翻訳を達成することが可能である。開始シグナルの例には、ATG開始コドンと、コザック配列など近傍の配列とが含まれる。SECP をコードするポリヌクレオチド配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コード配列或いはその断片のみが挿入される場合は、インフレームATG開始コドンなど外来性の翻訳制御シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳エレメント及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である(Scharf, D.他(1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125162)。

30

【0182】

当業者に周知の方法を用いて、SECPをコードするポリヌクレオチド、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる(Sambrook 及びRussell, 前出, 1-4, 8章、Ausubel 他, 前出, 1, 3, 15章)。

40

【0183】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、SECPをコードするポリヌクレオチドの保持及び発現ができる。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌などの微生物や、ウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウイルス: CaMV又はタバコモザイクウイルス: TMV)又は細菌発現ベクター(例えばTi又はpBR322プラスミド)で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系等があ

50

る(Sambrook及びRussell,前出、Ausubel 他、前出、Van Heeke, G. 及び S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:55035509; Engelhard, E.K. 他(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V.他(1996) Hum.Gene Ther.7:1937-1945、Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311; 『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill, New York NY, 191-196ページ、Logan, J.及びT. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J. J. 他(1997) Nat. Genet. 15:157-355)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス又はワクシニアウイルス由来の発現ベクター、又は種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ポリヌクレオチドを標的器官、組織又は細胞集団へ送達することができる(Di Nicola, M.他(1998) Cancer Gen. Ther. 5:350-356; Yu, M.他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6340-6344; Buller, R.M.他(1985) Nature 317:813-815; Mcgregor, D.P.他(1994) Mol. Immunol. 31:219-226; Verma, I.M.及びN. Somia (1997) Nature 389:239-242)。本発明は使用する宿主細胞によって限定されない。

10

20

30

40

50

【0184】

細菌系では、SECPをコードするポリヌクレオチドの使用目的に応じて多数のクローニングベクター及び発現ベクターを選択し得る。例えばSECPをコードするポリヌクレオチドの慣例的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)又はPSPORT1 プラスミド(Invitrogen)などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。SECPをコードするポリヌクレオチドをベクターのマルチクローニング部位にライゲーションするとlacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における *in vitro* 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖のレスキュー、入れ子欠失の生成にも有用である(Van Heeke, G. 及び S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509)。抗体の産生などのために多量のSECPが必要な場合は、SECPの発現を高レベルで誘導するベクターが使用し得る。例えば、強力な誘導SP6バクテリオファージプロモーター又は誘導T7バクテリオファージプロモーターを持つベクターが使用できる。

【0185】

酵母の発現系を使用してSECPを産出し得る。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーター等の構成的プロモーター又は誘導的プロモーターを有する多数のベクターが、出芽酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はピキア酵母 (*Pichia pastoris*) に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の、分泌か細胞内での保持かのどちらかを指示するものであり、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来ポリヌクレオチド配列群を組み込むことを可能にする(Ausubel他、前出; Bitter, G.A.他(1987) Methods Enzymol.153:516-544; Scorer, C.A.他(1994) Bio/Technology 12:181-184)。

【0186】

植物系を使用してSECPを発現することも可能である。SECPをコードするポリヌクレオチドの転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはTMV由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いられるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモーターによって促進される(Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311)。或いは、RUBISCOの小サブユニットなどの植物プロモーター、又は熱ショックプロモーターを用い得る(Coruzzi, G.他(1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R.他(1984) Science 224:838-843; Winter, J.他(1991) Results Probl.Cell Differ. 17:85105)。これらの作成物を、植物細胞に、直接DNA形質転換又は病原体を媒介した形質移入で導入できる(『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology)(1992) McGraw Hill, New York NY,191-196ページ)。

【0187】

哺乳類細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写物/翻訳複合体にSECPをコードするポリヌクレオチドを連結し得る。

アデノウイルスゲノムの非必須の E 1 又は E 3 領域への挿入することにより、感染した宿主細胞に SECP を発現する生ウイルスを得ることが可能である (Logan, J. 及び Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659)。更に、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて、哺乳類宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40 又は EBV をベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【0188】

また、ヒト人工染色体 (HAC) 類を用いて、或るプラスミドに含まれ得る断片やプラスミドから発現し得る断片より大きな DNA 断片群を送達し得る。治療のために約 6 kb ~ 10 Mb の HACs が作製され、従来の送達方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、又はベシクル) で送達されている (Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:157-355)。

10

【0189】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞における SECP の安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターを用いて、SECP をコードするポリヌクレオチドを株化細胞に形質転換することが可能である。このような発現ベクターは、ウイルス起源の複製要素及び / 又は内因性の発現要素や、同じベクター上に或いは別のベクター上に選択マーカー遺伝子を含み得る。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約 1 ~ 2 日間、細胞を増殖させ得る。選択可能マーカーの目的は選択剤への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーの存在により、導入した配列の発現に成功するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖できる。

20

【0190】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、 tk^- 細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子と、 apr^- 細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスのアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある (Wigler, M. 他 (1977) Cell 11:223-232; Lowy, I. 他 (1980) Cell 22:817-823)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えば $dhfr$ はメトトレキセートに対する耐性を与え、 neo はアミノグリコシドであるネオマイシン及び G-418 に対する耐性を与え、 als はクロルスルフロンに対する耐性を、 pat はホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える (Wigler, M. 他 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. 他 (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14)。更なる選択可能な遺伝子、例えば $trpB$ と $hisD$ とが記載され、これらは代謝物についての細胞要求を変容させる (Hartman, S.C. 及び R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051)。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質 グルクロニド、又はルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、形質転換体を同定するだけでなく、特定のベクター系に起因しうる一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することも可能である (Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131)。

30

【0191】

マーカー遺伝子発現の有無によって当該の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、SECP をコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、SECP をコードするポリヌクレオチドを含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定可能である。又は、1 つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子が SECP をコードする配列とタンデムに配置することも可能である。誘導又は選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

40

【0192】

一般に、SECP をコードするポリヌクレオチドを持ち、SECP を発現する宿主細胞は、当業者に周知の種々の方法を用いて同定できる。これらの方法には、DNA - DNA 或いは DNA - RNA ハイブリダイゼーションや、PCR 法、核酸或いはタンパク質の検出及び / 又は数量化のた

50

めの膜系、溶液ベース、或いはチップベースの技術を含むタンパク質生物学的試験法又は免疫学的アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0193】

特異的ポリクローナル抗体又は特異的モノクローナル抗体を用いてSECPの発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、当分野で公知である。このような技術の例としては、酵素に結合した免疫吸着剤検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、フローサイトメーター(FACS)などが挙げられる。SECP上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ(two-site, monoclonal-based immunoassay)が好ましいが、競合結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及び他のアッセイは、当分野で周知である(Hampton, R.他(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN, Sect.IV; Coligan, J.E.他(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience, New York NY; Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ)。

10

【0194】

多岐にわたる標識方法及び抱合技術が当業者に知られており、様々な核酸アッセイ及びアミノ酸アッセイにこれらの技術を用い得る。SECPをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはPCRプローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、又は標識されたヌクレオチドを用いるPCR増幅が含まれる。別法として、SECPをコードするポリヌクレオチド群、又はその任意の断片群を、mRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングできる。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3又はSP6などの好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、in vitroでRNAプローブの合成に用いることができる。これらの方法は、例えばAmersham Biosciences、Promega(Madison WI)、U.S. Biochemicalなどの種々の市販キットを用いて実行できる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色原体などがある。

20

【0195】

SECPをコードするポリヌクレオチドで形質転換した宿主細胞を、細胞培地での該タンパク質の発現と回収とに好適な条件下で培養しうる。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、或いはその両者に依存する。SECPをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜及び真核細胞膜を透過してのSECPの分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できることは、当業者には理解されよう。

30

【0196】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入したポリヌクレオチドの発現をモジュレートする能力、又は発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」又は「プロ」形を切断する翻訳後のプロセッシングを利用して、タンパク質の標的への誘導、折りたたみ及び/又は活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための、特定の細胞機構及び特徴的な機序を持つ、種々の宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、WI38など)は、American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にするように選択し得る。

40

【0197】

本発明の別の実施例では、SECPをコードする天然のポリヌクレオチド、修飾されたポリヌクレオチド、又は組換えのポリヌクレオチドを上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に連結させ得る。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラSECPタンパク質が、SECP活性のインヒビターに対するペプチドライブラリの

50

スクリーニングを促進し得る。異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分はまた、市販されている親和性マトリックスを用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトプタグを特異的に認識する市販のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、SECPをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、SECPが精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のAusubel他(前出、10及び16章)に記載がある。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

10

【0198】

別の実施態様では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液又はコムギ胚芽抽出系(Promega)を用いて *in vitro* で、放射能標識したSECPの合成が可能である。これらの系は、T7、T3又はSP6プロモーターに機能的に連結したタンパク質コード配列群の、転写と翻訳とを共役させる。翻訳は、例えば³⁵Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

20

【0199】

SECPに特異的に結合する化合物をスクリーニングするために、SECP、SECPの断片、或いはSECPの変異体を用いることは可能である。1つ以上の試験化合物を用いて、SECPへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。種々の実施態様で、1、2、3、4、5、10、20、50、100、又は200個の試験化合物をSECPへの特異結合につきスクリーニングできる。試験化合物の例として、抗体、アンティカリン(anticalins)、オリゴヌクレオチド、タンパク質(例えばリガンドや受容体)、又は小分子が挙げられる。

【0200】

関連の実施態様で、SECP変異体を用いて試験化合物たとえば抗体の、SECPへの結合や、SECP変異体へ、又は組み合わせたSECP及び/又は1つ以上のSECP変異体への結合をスクリーニングできる。ある実施態様においては、SEQ ID NO:1-32の配列の正確な配列を有するSECPではなく、SECPの変異体に結合する化合物のスクリーニングにSECPの変異体を用いることができる。このようなスクリーニングを行うために使うSECP変異体はSECPに約50%から約99%の範囲で配列同一性を有し得る。また、種々の実施例で60%、70%、75%、80%、85%、90%、及び95%の配列同一性を有することができる。

30

【0201】

或る実施態様でSECPへの特異結合スクリーニングで同定された化合物は、SECPの天然リガンドに密接に関連する場合があり、例えばリガンドやその断片であり、又は天然基質や、構造的又は機能的な擬態物質(mimetic)、或いは自然結合パートナーである(Coligan, J.E. 他(1991) *Current Protocols in Immunology* 1(2):5章)。別の実施態様では、こうして同定した化合物は、受容体SECPの天然リガンドでありうる(Howard, A.D. 他(2001) *Trends Pharmacol.Sci.* 22:132-140; Wise, A. 他(2002) *Drug Discovery Today* 7:235-246)。

40

【0202】

別の実施態様でSECPへの特異結合スクリーニングで同定した化合物は、SECPが結合する天然受容体に、或いは少なくとも該受容体の或る断片に、又は例えばリガンド結合部位や結合ポケットの全体又は一部を含む該受容体の或る断片に、密接に関連し得る。例えば該化合物は、シグナルを伝播可能なSECP受容体の場合や、シグナルを伝播できないSECPおとり受容体の場合がある(Ashkenazi, A. 及びV.M. Divit (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:255-260、Mantovani, A. 他(2001) *Trends Immunol.* 22:328-336)。該化合物は既知の

50

技術を用いて合理的に設計できる。こうした技術の例としては、化合物エタネルセプト (etanercept) (ENBREL; Amgen Inc., Thousand Oaks CA) 作製に用いた技術を含む。エタネルセプトは、ヒトのリウマチ様関節炎の治療に有効である。エタネルセプトは遺伝子操作されたp75腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ダイマーであり、ヒトIgG₁ のFc部分に連結されている (Taylor, P.C. 他 (2001) *Curr. Opin. Immunol.* 13:611-616)。

【0203】

1つの実施態様では、類似或いは異なる特異性を有する2つ以上の抗体がSECP、SECPの断片、或いはSECPの変異体への特異的結合のためにスクリーニングされ得る。こうしてスクリーニングした抗体の結合特異性を選択し、SECPの特定の断片又は変異体を同定できる。1つの実施態様で、SECPの特定の断片又は変異体を優先的に同定できる結合特異性を持つ抗体を選択できる。別の実施態様では、或る抗体が、その結合特異性によりSECPの増加した、減少した、或いは異常な生成を有する特定の疾患或いは症状の選択的な診断を可能にするように選択され得る。

10

【0204】

1つの実施態様で、anticalinを、SECP又はその断片或いは変異体への特異結合につきスクリーニングできる。anticalinはリポカリン足場に基づいて作成されたりガンド結合タンパク質である (Weiss, G.A. 及び H.B. Lowman (2000) *Chem. Biol.* 7:R177-R184, Skerra, A. (2001) *J. Biotechnol.* 74:257-275)。リポカリン類のタンパク構造には8本鎖逆平行ストランドを持つ或るパレルを含むことがあり、このパレルはその開放端で4つのループを支持する。これらのループはリポカリンの天然リガンド結合部位を形成し、この部位は *in vitro* でアミノ酸置換によって再度人工操作して、新規な結合特異性を与えることができる。このアミノ酸置換は当分野で既知の方法又は本明細書に記載の方法を用いて行うことができる。また、保存的置換 (例えば、結合特異性を変えないような置換)、或いは、結合特異性を少し、中等度、又は大きく変えるような置換を行うこともできる。

20

【0205】

一実施態様では、SECPに特異的に結合、刺激、或いは阻害する化合物のスクリーニングには、分泌タンパク質として、或いは細胞膜上でSECPを発現する、好適な細胞群の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエ、又は大腸菌からの細胞が含まれる。SECPを発現する細胞又はSECPを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、SECP又は化合物のいずれかの結合、刺激又は阻害を分析する。

30

【0206】

或るアッセイでは単に試験化合物がポリペプチドに結合するのを試験でき、結合を、フルオロフォア、放射性同位体、酵素抱合体又は他の検出可能な標識により検出する。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたSECPと混合させるステップと、SECPとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法で該アッセイは、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出又は測定を行うことができる。更にこのアッセイは、無細胞再構成標本、化学ライブラリ、又は、天然物の混合物を用いて実施でき、試験化合物 (群) は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定する。

40

【0207】

アッセイを用いて、或る化合物が、その天然リガンドに結合する能力、及び/又は、その天然リガンドの、その天然受容体への結合を阻害する能力を評価しうる。こうしたアッセイの例としては、米国特許第5,914,236号及び第6,372,724号に記載されたような放射ラベルアッセイを含む。関連した実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換が或るポリペプチド化合物 (受容体など) に導入され、その天然リガンドに結合する能力を向上又は改変しうる (Matthews, D.J. 及び J.A. Wells. (1994) *Chem. Biol.* 1:25-30)。別の関連した実施態様では、1つ以上のアミノ酸置換が或るポリペプチド化合物 (リガンドなど) に導入され、その天然受容体に結合する能力を向上又は改変しうる (Cunningham, B.C. 及び J.A. Wells (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3407-3411; Lowman, H.B. 他 (1991) *J. Biol.*

50

Chem. 266:10982-10988)。

【0208】

SECP或いはその断片又は変異体を用いて、SECPの活性をモジュレートする化合物をスクリーニングしうる。このような化合物としては、アゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニスト又は逆アゴニストなどが含まれ得る。ある実施態様では、SECPの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、そのアッセイでは少なくとも1つの試験化合物をSECPと混合し、試験化合物の存在下でSECPの活性を試験化合物不在下でのSECPの活性と比較する。試験化合物の存在下でのSECPの活性の変化は、SECPの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別の実施態様において、試験化合物をSECPの活性に適した条件下でSECPを含む *in vitro* 又は無細胞再構成系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイのいずれかにおいて、SECPの活性を調整する試験化合物は間接的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つ、又は複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

10

【0209】

別の実施態様では、胚性幹細胞 (ES細胞) における相同組み換えを用いて動物モデル系内で、SECP又はその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ロックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である (例えば米国特許第5,175,383号及び第5,767,337号を参照)。例えば129/SvJ細胞系などのマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (neo: Capecchi, M.R. (1989) *Science* 244:1288-1292) などのマーカー遺伝子で破壊した、当該の遺伝子を持つベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより、宿主ゲノムの対応する領域に組込まれる。或いは、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的又は発生段階特異的に目的遺伝子をロックアウトする (Marth, J.D. (1996) *Clin. Invest.* 97:1999-2002、Wagner, K.U. 他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:4323-4330)。形質転換したES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス株などから採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。これらの胚盤胞を偽妊娠メスに外科的移植し、得られるキメラ子孫の遺伝子型を決定し、これらを交配させてヘテロ接合性系又はホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒物で検査されうる。

20

【0210】

SECPをコードするポリヌクレオチドを *in vitro* でヒト胚盤胞由来のES細胞において操作することが可能である。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞タイプを含む、少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統及び心筋細胞に分化する (Thomson, J.A. 他 (1998) *Science* 282:1145-1147)。

30

【0211】

SECPをコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ロックイン」ヒト化動物 (ブタ) 又は遺伝子組み換え動物 (マウス又はラット) を作製することが可能である。ロックイン技術を用いて、SECPをコードするポリヌクレオチドのある領域を動物ES細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫又は近交系について試験し、潜在的医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばSECPを乳汁内に分泌するなどSECPを過剰に発現する哺乳動物近交系は、便利なタンパク質源となり得る (Janne, J. 他 (1998) *Biotechnol. Annu. Rev.* 4:55-74)。

40

【0212】

(治療)

SECPのいくつかの領域と分泌タンパク質群との間には、例えば配列及びモチーフの文脈における、化学的及び構造的類似性が存在する。またSECPを発現する組織の数例は、表6と実施例11を見られたい。従って、SECPは、細胞増殖異常、自己免疫/炎症性疾患、心血管障害、神経障害、及び発達障害において、或る役割を果たすと考えられる。SECPの発現

50

若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、SECPの発現又は活性を低下させることが望ましい。また、SECPの発現又は活性の低下に関連する疾患の治療においては、SECPの発現又は活性を増大させることが望ましい。

【0213】

したがって、一実施態様において、SECPの発現又は活性の低下に関連した疾患の治療又は予防のために、患者にSECP又はその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には細胞増殖異常、自己免疫/炎症疾患、心血管障害、神経障害、及び発達障害が含まれ、細胞増殖異常の中には日光角化症、動脈硬化、アテローム硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合性結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌など癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、及び子宮の癌が含まれ、自己免疫/炎症性の疾患の中には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病(慢性原発性副腎機能不全)、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィー(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患(胎児赤芽球症)、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、心血管障害の中には、鬱血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪部石灰化(mitral annular calcification)、僧帽弁逸脱、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心移植の合併症、動静脈瘻、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管系腫瘍、血栓溶解の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術(vascular replacement)、冠動脈バイパス移植術が含まれ、神経障害の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症(色素性網膜炎)、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、プリオン病(クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、及びGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、ダウン症を含む中枢神経系性精神遅滞及び他の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄疾患、筋ジストロフィー他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神障害(気分性、不安性の障害、統合失調症/分裂病)、季節性感情障害(SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、遅発性ジスキネジア、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性(corticobasal degeneration)、及び家族性前頭側頭型痴呆とが含まれ、また発達障害も含まれ、その中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性

10

20

30

40

50

小人症、デュシェンヌノベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞）、スミス マジェニス症候群（Smith- Magenis syndrome）、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症や、シャルコーマリーツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症や、Syndenham舞蹈病（Syndenham's chorea）及び脳性小児麻痺などの発作障害、二分脊椎、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴が含まれる。

【0214】

別の実施態様では、SECP又はその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与して、上記しだけに限られるものではないが疾患を含むSECPの発現又は活性の低下に関連した疾患を治療又は予防することも可能である。

10

【0215】

さらに別の実施態様では、実質的に精製されたSECPを含む組成物を好適な医薬用キャリアと共に患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むSECPの発現又は活性の低下に関連した疾患を治療又は予防することも可能である。

【0216】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むSECPの発現又は活性の低下に関連した疾患の治療又は予防のために、SECPの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【0217】

更なる実施例では、SECPの発現又は活性の増大に関連した疾患の治療又は予防のために、患者にSECPのアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した細胞増殖異常、自己免疫/炎症疾患、心血管疾患、神経系疾患、及び発達異常が含まれる。一実施態様では、SECPと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはSECPを発現する細胞又は組織に薬剤を運ぶ標的化機構、或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

20

【0218】

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

【0219】

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

30

【0220】

SECPのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。詳しくは、精製されたSECPを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてSECPと特異的に結合するものの同定が可能である。SECPに対する抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、Fab断片、及びFab発現ライブラリによって作られた断片が含まれる。但し、これらに限定されるものではない。一実施態様では、中和抗体（すなわち、二量体形成を阻害する抗体）は治療的に使用され得る。一本鎖抗体（例えばラクダ又はラマに由来する）は強力な酵素インヒビターであり得る。またペプチド擬態物質の設計及び免疫吸着剤とバイオセンサーの開発に用途を有し得る (Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

40

【0221】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、SECP又は任意の断片、又は免疫原性の特

50

性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、スカシガイのヘモシアニン (KLH)、ジニトロフェノールなどの界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG(カルメット ゲラン桿菌)及びコリネバクテリウム パルバム (*Corynebacterium parvum*) が特に好ましい。

【 0 2 2 2 】

SECPに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、又は断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなり、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチド又は断片はまた、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と実質的に同一であることが望ましい。SECPのアミノ酸群の短い区間を、KLHなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体を産生し得る。

【 0 2 2 3 】

SECPに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製することが可能である。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、及びEBV-ハイブリドーマ技術がある (Kohler, G.他(1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D.他(1985) J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote, R.J.他(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole, S.P.他(1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120)。

【 0 2 2 4 】

更に、「キメラ抗体」作製のために開発された技術、例えば、ヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るために用いられる (Morrison, S.L. 他(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Neuberger, M.S. 他(1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.他(1985) Nature 314:452-454)。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、SECP特異的一本鎖抗体を生成する。関連した特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる (Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137)。

【 0 2 2 5 】

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

【 0 2 2 6 】

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

【 0 2 2 7 】

種々の免疫学的検定 (イムノアッセイ) を用いてスクリーニングすることにより、所望の特異性を有する抗体を同定し得る。確立された特異性を有するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の何れかを用いる競合的結合アッセイ、又は免疫放射定量測定法のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このような免疫測定法には、SECPとその特異性抗体との間の複合体の計測が含まれる。二つの非干渉性SECPエピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセ

イが一般に利用されるが、競合的結合アッセイも利用することができる(Pound、前出)。

【0228】

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

10

【0229】

ポリクローナル抗体製剤の抗体価及び結合活性を更に評価して、後に使う或る適用例に対するこのような製剤の品質及び適合性を決定することができる。例えば、少なくとも $1 \sim 2$ mg/mlの特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10$ mg/mlの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体試薬は一般に、SECP抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。抗体の特異性、抗体価、及び結合力の評価手順、並びに、様々な適用例における抗体の品質と使用に対する指針については、一般に入手可能である(Catty、前出; Coligan 他、前出)。

20

【0230】

本発明の別の実施例では、SECPをコードするポリヌクレオチド、又はその任意の断片や相補配列を、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、SECPをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子(DNA、RNA、PNA、又は修飾ヌクレオチド)を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又は大きな断片が、SECPをコードする配列の制御領域から、又はコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である(Agrawal, S., 編集 (1996) Antisense Therapeutics, Humana Press., Totawa NJ)。

30

【0231】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を適切な標的細胞に導入するのに好適な、任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を作製する発現プラスミドの形で、細胞内に送達し得る(Slater, J.E.他(1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:469-475; Scanlon, K.J.他(1995) 9:1288-1296)。アンチセンス配列はまた、細胞内に、ウイルスベクター例えばレトロウイルス及びアデノ随伴ウイルスのベクターを用いて導入しうる(Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271; Ausubel他、前出; Uckert, W.及びW. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63:323-347)。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ及び当分野で公知のその他のシステムが含まれる(Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51:217-225; Boado, R.J.他(1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315; Morris, M.C.他(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:2730-2736)。

40

【0232】

本発明の別の実施例では、SECPをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療により、(i) 遺伝子欠損症を治療し(例えばX染色体連鎖遺伝(Cavazzana-Calvo, M.他(2000) *Science* 288:669-672)により特徴付けられる重症複合型免疫不全(SCID)-X1病の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症に関連する重症複合型免疫不全症候群(Blaese, R.M. 他(1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C.他(1995) *Science* 270:470-475)、嚢胞性繊維症

50

(Zabner, J.他(1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G.他(1995) Hum.Gene Therapy 6:643-666; Crystal, R.G.他(1995) Hum.Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア(thalassaemia)、家族性高コレステロール血症や、第8因子若しくは第9因子欠損に起因する血友病(Crystal, R.G. (1995) Science 270:404-410、Verma, I.M. 及び N. Somia (1997) Nature 389:239-242)、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ(例えば無秩序な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii) 細胞内の寄生体、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV) (Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poeschla, E.他(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399) などヒトレトロウイルス、B型若しくはC型肝炎ウイルス(HBV、HCV)、Candida albicans及びParacoccidioides brasiliensis等の寄生真菌、並びに熱帯熱マラリア原虫及びクルーズトリパノソーマ等の寄生原虫に対する保護作用を与えるタンパク質を発現できる。SECPの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からSECPを発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

【0233】

本発明の更なる実施例では、SECPの欠損による疾患や異常症は、SECPをコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってSECP欠損細胞に導入することによって治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的導入技術には、(i)個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii)遺伝子銃、(iii)リポソームを介した形質移入、(iv)受容体を介した遺伝子導入、及び(v)DNAトランスポゾンの使用がある(Morgan, R.A. 及び W.F. Anderson(1993)Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z.(1997)Cell 91:501-510; Boulay, J-L. 及びH. Recipon(1998)Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)。

【0234】

SECPの発現に効果的である発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAX、PCR2-TOPOTAベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)、PCM VSCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV(Stratagene, La Jolla CA)及びPTETOFF、PTETON、PTR E2、PTRE2LUC、PTKHYG(Clontech, Palo Alto CA)が含まれる。SECPを発現させるために、(i)恒常的に活性なプロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ(TK)、若しくは - アクチン遺伝子等)、(ii)誘導性プロモーター(例えば、市販されているT-REXプラスミド(Invitrogen)に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター(Gossen, M. 及び H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551; Gossen, M. 他(1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. 及び H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、エクジソン誘導性プロモーター(市販されているプラスミドPVGRXR及びPINDに含まれている:Invitrogen)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、又はRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター(Rossi, F.M.V. 及び H.M. Blau, 前出)、又は(iii)正常な個体に由来するSECPをコードする内因性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

【0235】

市販のリポソーム形質転換キット(例えばInvitrogen社のPerFect Lipid Transfection Kit)を用いれば、当業者は実験の各パラメータを最適化する努力をさほど要さず、ポリヌクレオチド群を、培養中の標的細胞群に送達し得る。別法では、リン酸カルシウム法(Graham, F.L. 及び A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467)若しくは電気穿孔法(Neuman, E. 他(1982)EMBO J. 1:841-845)を用いて形質転換を行う。初代培養細胞にDNAを導入するためには、これら標準化された哺乳類形質移入プロトコルの修正が必要である。

【0236】

本発明の別の実施例では、SECPの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i)レトロウイルス末端反復配列(LTR)プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でSECPをコードするポリヌクレオチドと、(ii)好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii)追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベ

クターの増殖に必要なコーディング配列を伴うRev応答性エレメント (RRE) とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター (例えばPFB及びPFBNE0) はStratagene社から市販されており、刊行データ (Riviere, I. 他 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737) に基づく。上記データは参照により開示に含まれる。このベクターは、好適なベクター産生細胞株 (VPCL) において増殖される。VPCLは、各標的細胞上の受容体への向性を持つエンベロープ遺伝子を、又はVSVgなど汎親和性エンベロープタンパク質を発現する (Armentano, D. 他 (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. 他 (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. 及び A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. 他 (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. 他 (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。Riggに付与された米国特許第5,910,434号 (「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」) において、レトロウイルスパッケージング細胞株を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクター類の繁殖や、細胞集団 (例えばCD4⁺T細胞群) の形質導入、及び形質導入した細胞群の患者への戻しは、遺伝子治療分野では当業者に周知の手法であり、多数の文献に記載がある (Ranga, U. 他 (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. 他 (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0237】

或る実施態様では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、SECPの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にSECPをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクター類の作製及びパッケージングについては、当業者に周知である。複製欠損型アデノウイルスベクター類は、種々の免疫調節タンパク質をコードする遺伝子群を、無損傷の臍島内に導入する目的で多様に利用し得ることが証明された (Cs ete, M.E. 他 (1995) Transplantation 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号 (「Adenovirus vectors for gene therapy」) に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクター類については、Antinozzi, P.A. 他 (1999; Annu. Rev. Nutr. 19:511-544) 並びにVerma, I.M. 及び N. Somia (1997; Nature 18:389:239-242) を参照されたい。

【0238】

別の実施態様では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、SECPの発現に関連する1つ以上の遺伝子異常を有する標的細胞に、SECPをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純ヘルペスウイルス (HSV) 系のベクターは、HSV親和性の中樞神経細胞にSECPを導入する際に特に有用であり得る。ヘルペス系ベクター類の作製及びパッケージングは、当業者に公知である。或る複製適格性単純ヘルペスウイルス (HSV) 1型系のベクターが、或るレポーター遺伝子の、霊長類の眼への送達に用いられている (Liu, X. 他 (1999) Exp. Eye Res. 169:385395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号 (「Herpes simplex virus strains for gene transfer」) に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92の使用についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22を欠失した組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクター類については、Goins, W.F. 他 (1999; J. Virol. 73:519-532) 及び Xu, H. 他 (1994; Dev. Biol. 163:152-161)。クローン化したヘルペスウイルス配列群の操作、大ヘルペスウイルスゲノム (large herpesvirus genomes) の様々なセグメントを持つ複数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びに細胞群へのヘルペスウイルスの感染は、当業者に公知の技術である。

【0239】

別の実施態様では、ウイルス（正の一本鎖RNAウイルス）ベクターを用いてSECPをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス（Semliki Forest Virus, SFV）の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクター類はSFVゲノムに基づく（Garoff, H. 及び K.-J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9:464-469）。ウイルスRNAの複製中に、ウイルスのカプシドタンパク質群を通常はコードする、サブゲノムRNAが産生される。このサブゲノムRNAは完全長ゲノムRNAよりも高レベルに複製するので、酵素活性（例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ）を持つウイルスタンパク質に比べてカプシドタンパク質群が過剰産生される。同様に、ウイルスゲノムに、キャプシドをコードする領域の代わりにSECPのコード配列を導入することによって、ベクター導入細胞において多数のSECPをコードするRNAが産生され、高いレベルでSECPが合成される。通常、ウイルスの感染は、数日以内の細胞溶解を伴う。一方、シンドビスウイルス（SIN）の或る変異体を有するハムスター正常腎臓細胞（BHK-21）群が持続的な感染を確立する能力は、ウイルス類の溶解複製を、遺伝子治療に応用し得るように好適に改変可能であることを示唆する（Dryga, S.A.他(1997) *Virology* 228:74-83）。様々な宿主にウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にSECPを導入することできる。或る集団における或るサブセットの細胞群の特異的形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。ウイルスの感染性cDNAクローンの操作方法、ウイルスのcDNA及びRNAの形質移入方法及びウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

10

20

【0240】

転写開始部位（transcription initiation site）由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。この位置は、例えばスタート部位（start site）から数えて約 - 10 と約 + 10 の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん対合は、ポリメラーゼ、転写因子又は制御分子と結合できるように十分に開こうとする、二重らせんの能力を阻害するので有用である。三重鎖DNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある（Gee, J.E.他(1994) in Huber, B.E. 及び B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, 163-177ページ）。相補配列又はアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を妨害するように設計することができる。

30

【0241】

リボザイムは酵素的RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用の機序は、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後起こるヌクレオチド鎖切断に關与している。例えば、操作されたハンマーヘッド型リボザイム分子は、SECPをコードするRNA分子のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ効果的に触媒する可能性がある。

【0242】

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

40

【0243】

相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のための当分野で既知の任意の方法を用いて作製し得る。作製方法には、固相ホスホラミダイト化学合成など、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、RNA分子は、SECPをコードするDNA分子の *in vitro* 及び *in vivo* 転写によって産出し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6などの好

50

適なRNAポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に取り込むことが可能である。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するこれらのcDNA構築物を、細胞株、細胞又は組織内に導入できる。

【0244】

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

10

【0245】

発明の別の実施様態では、本発明の1つ以上の選択されたポリヌクレオチドの発現を、当分野で知られているRNA干渉(RNAi)又は転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)方法を用いて変更、阻害、低下、又は抑制し得る。RNAiは、遺伝子サイレンシングの転写後モードであり、標的細胞に導入された二本鎖RNA(dsRNA)が相同遺伝子(例えば、dsRNAに相補的な配列を有する遺伝子)の発現を特異的に抑制する。これは効果的に標的遺伝子の発現をノックアウトするか、実質的に低下させる。PTGSはまた、DNA或いはDNA断片の使用によっても達成され得る。RNAi法の記載はFire, A.他(1998; Nature 391:806-811)及びGura, T. (2000; Nature 404:804-808)がある。PTGSを開始するにはまた、選択した組織にDNAの相補セグメントを導入して行うことができ、これには本願記載の、又は当該分野で既知の、遺伝子送達及び/又はウイルスベクター送達法を用いる。

20

【0246】

RNAiを哺乳類細胞内で誘導するには、低分子干渉(small interfering)RNA、略称siRNAの利用で可能となる。siRNAはdsRNAの短いセグメント(通常、約21~23ヌクレオチド長)であり、in vivoで、導入したdsRNAが内因性リボヌクレアーゼの作用で切断されて生じる。siRNAは、哺乳類でのRNAi効果のメディエーターであると思われる。最も有効なsiRNAは、21ヌクレオチドdsRNAで2ヌクレオチドの3'オーバーハングを持つRNAのようである。siRNAを用いたRNAiの哺乳類細胞での誘導は、Elbashir, S.M.他(2001; Nature 411:494-498)に記載がある。

30

【0247】

siRNAを産生するには、直接にdsRNAを標的細胞に導入するか、間接的に、本願記載又は当該分野で既知の哺乳類トランスフェクション法及び媒介物(例えば、リボソームを介したトランスフェクション、ウイルスベクター法、又は他のポリヌクレオチド送達/導入法)で可能である。好適なsiRNAを選ぶには、AUG開始コドンから下流のヌクレオチド配列群について標的ポリヌクレオチドの転写物(例えばmRNA)を検討し、各ヌクレオチドと3'側の隣接する19~23ヌクレオチドの出現を潜在的siRNA標的部位として記録して可能であり、21ヌクレオチド長を持つ配列が好ましい。標的siRNA部位として避けるべき領域としては、5'と3'の非翻訳領域(UTR)、及び開始コドンに近い領域(75塩基以内)があり、理由は、これらは調節タンパク質結合部位が、より豊富なためである。UTR結合タンパク及び/又は翻訳開始複合体は、siRNPエンドヌクレアーゼ複合体の結合に干渉しうる。siRNAのために選択した標的部位は次に、適切なゲノムデータベース(例えばヒト等のもの)と比較でき、これにはBLAST又は他の、当該分野で既知の配列比較アルゴリズムを用いる。標的配列の内、他のコード配列への有意な相同性を持つ配列は、考慮から除外できる。選択したsiRNAを産生するには、当該分野で既知の化学合成法で、又はin vitro転写に市販の方法とキット、例えばSILENCER siRNA作製キット(Ambion, Austin TX)を用いて可能である。

40

【0248】

別の実施様態で、長期の遺伝子サイレンシング及び/又はRNAi効果を、選択した組織で誘導でき、これにはsiRNAを持続的に発現する発現ベクターを用いる。これを達成するに

50

は、操作して(短い)ヘアピンRNA (shRNA)を発現するようにした発現ベクターを用い、これには当該分野で既知の方法を用いる(例えばBrummelkamp, T.R.他(2002) Science 296:550-553; 及びPaddison, P.J.他(2002) Genes Dev. 16:948-958参照)。これら及び関連の実施態様でshRNAを標的細胞に送達するには、当該分野で既知の発現ベクターを用い得る。siRNAの送達に好適な発現ベクターの一例はPSILENCER1.0-U6 (circular)プラスミド(Ambion)である。標的組織に送達されると、shRNAは*in vivo* でプロセスされてsiRNA様分子となり、これは遺伝子特異的サイレンシングを行える。

【0249】

種々の実施態様で、RNAi又はPTGS法が標的にする遺伝子の発現レベルの判定は、mRNA及び/又はタンパク質解析用のアッセイで行える。或る標的遺伝子のmRNAの発現レベル判定は、ノーザン解析法に例えばNORTHERNMAX-GLYキット(Ambion)を用いて、またマイクロアレイ法で、PCR法で、リアルタイムPCR法で、また他の、当該分野で既知又は本願記載のRNA/ポリヌクレオチドアッセイで行える。標的遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルの判定は、ウェスタン解析に当該分野で既知の標準技術を用いて行える。

10

【0250】

本発明の更なる実施例は、SECPをコードするポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの発現改変を起こすのに有効であり得る化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチドや、転写因子などのポリペプチド転写制御因子、及び、特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学物質がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビター又はプロモーターのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を改変し得る。従って、SECPの発現又は活性の増加に関連する疾患の治療においては、SECPをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有用であり、SECPの発現又は活性の低下に関連する疾患の治療においては、SECPをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物が治療上有用であり得る。

20

【0251】

種々の実施態様で、或る特定ポリヌクレオチドの発現を改変する際の有効性について、1つ以上の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物を得るには、当分野で公知の任意の方法を用い得る。取得方法としては、以下の場合に有効な既知化合物の化学修飾がある。ポリヌクレオチドの発現を改変する場合と、既存の、市販の又は私的な、天然又は非天然の化学物質のライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/又は構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組み合わせ的に又は無作為に生成した化学物質のライブラリから選択する場合とである。SECPをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、このようにして得られた試験化合物の少なくとも1つに曝露する。サンプルは例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、或いは*in vitro* 無細胞系すなわち再構成生化学系があり得る。SECPをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、SECPをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特異ヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量することにより、1つ以上の試験化合物に曝露される、又は曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較のための基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を改変する際に試験化合物が有効であることを示す。或る特定ポリヌクレオチドの改変発現に有効な化合物のためのスクリーニングを実行でき、例えば分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他(1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他(2000) Nucleic Acid Res.28:E15) 又はHeLa細胞等のヒト細胞株 (Clarke, M.L. 他(2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13) を用いて行い得る。本発明の或る特定の実施態様は、或る特定ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性について、オリゴヌクレオチド(デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾したオリゴヌクレオチド

30

40

50

) のコンビナトリアルライブラリをスクリーニングする過程に関する (Bruice, T.W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W.他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

【0252】

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

【0253】

上記の治療方法はどれも例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サルなどの哺乳類を含め、そうした治療が必要な任意の被験体に適用できる。

【0254】

本発明の或る更なる実施態様は、薬剤的に許容される或る賦形剤と共に処方される或る活性成分を一般に有する、或る組成物の投与に関する。賦形剤には例えば、糖、でんぷん、セルロース、ゴム及びタンパク質がある。様々な剤型が広く知られており、詳細は Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に記載されている。このような組成物は、SECP、SECPの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、又はSECPのインヒビターなどからなる。

【0255】

種々の実施態様で、本願に記載の組成物たとえば医薬組成物は、任意の数の経路によって投与でき、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下又は直腸法がある。

【0256】

肺から投与する組成物は、液状又は乾燥粉末状で調製し得る。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子 (例えば伝統的な低分子量有機薬) の場合には、速効製剤のエアロゾル送達は当分野で公知である。高分子 (例えばより大きなペプチド及びタンパク質) の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺送達が可能にした (Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号などを参照)。肺送達は、針注射なしに投与でき、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくす。

【0257】

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

【0258】

SECP又はその断片を含む高分子を直接細胞内に送達するべく、特殊な形態に組成物が調製されるのが好ましい。例えば、細胞不透過性高分子を有するリポソーム製剤は、その高分子の細胞融合と細胞内送達とを促進し得る。別法では、SECP又はその断片をHIV Tat-1タンパク質の陽イオン性N末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質類は、或るマウスモデル系の、脳を含む全ての組織の細胞群に形質導入することがわかっている (Schwarze, S.R. 他 (1999) Science 285:1569-1572)。

【0259】

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

【0260】

10

20

30

40

50

治療有効量は、症状や容態を回復させる活性処方成分（例えば、SECP又はその断片、SECPの抗体、SECPのアゴニスト又はアンタゴニスト、インヒビターなど）量を意味する。治療有効性及び毒性は、細胞培養又は実験動物における標準的な薬剤手法によって、例えばED₅₀（集団の50%の治療有効量）又はLD₅₀（集団の50%の致死量）の統計を計算するなどして決定することができる。毒性効果の、治療効果に対する用量比が治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。高い治療指数を示すような組成物が望ましい。細胞培養アッセイと動物実験とから得られたデータは、ヒトに用いる投与量の範囲の策定に用いられる。このような組成物に含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く持たず、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。投与量は、用いられる剤形、患者の感受性及び投与の経路によってこの範囲内で変わる。

10

【0261】

正確な投与量は、治療が必要な被検者に関する要素を考慮して、実務医が決定することになる。十分なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持すべく、用法及び用量を調整する。被検者に関する要素としては、病態の重症度、被検者の全身健康状態、患者の年齢、体重及び性別（ジェンダー）、投与の時間及び頻度、併用薬、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮しうる。長時間作用性の組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス速度によって3～4日毎に1度、毎週、或いは隔週の間隔で投与し得る。

【0262】

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

20

【0263】

(診断)

別の実施例では、SECPに特異的に結合する抗体が、SECPの発現によって特徴付けられる疾患の診断、又はSECPやSECPのアゴニスト又はアンタゴニスト、インヒビターで治療を受けている患者をモニターするためのアッセイに用いられる。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で作成される。SECPの診断アッセイには、抗体及び標識を用いてヒトの体液或いは細胞や組織から採取されたものからSECPを検出する方法が含まれる。この抗体は、修飾して、又は修飾せずに使用される。また、レポーター分子との共有結合又は非共有結合で標識化できる。レポーター分子としては広くさまざまな種類が本分野で知られており、また使用可能であるが、そのうちのいくつかは上記で説明されている。

30

【0264】

SECPを測定するためのELISA, RIA, 及びFACSを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのSECPの発現を診断する元となるものを提供する。正常或いは標準的なSECPの発現の値は、複合体の形成に適した条件下で、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験者から採取した体液又は細胞とSECPに対する抗体とを混合させることによって決定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。被験者、対照、及び疾患生検組織からの各サンプルのSECPの発現の量が基準値と比較される。基準値と被験体との偏差が、疾患を診断するパラメータを確定する。

40

【0265】

本発明の別の実施態様では、SECPをコードするポリヌクレオチドを、診断目的で用い得る。用い得るポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と関連し得るSECPを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出し定量する。この診断アッセイを用いて、SECPの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のSECP値の調節を監視する。

【0266】

或る実施形態では、SECP又は近縁の分子をコードする、ゲノム配列などポリヌクレオチ

50

ドを検出可能なPCRプローブ類とのハイブリダイゼーションを、SECPをコードする核酸配列を同定するために用いることができる。プローブが高度に特異的な領域（例えば5'調節領域）から作られているか、或いはやや特異性の低い領域（例えば保存されたモチーフ）から作られているかにかかわらず、そのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェントによって、そのプローブがSECPをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子や関連配列をコードする自然界の配列のみを同定するかどうかが決まるであろう。

【0267】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、SECPをコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNA或いはRNAが可能であり、SEQ ID NO:33-64の配列、或いはSECP遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0268】

SECPをコードするポリヌクレオチド群に対して特異的なハイブリダイゼーションプローブ群の作製手段としては、SECP又はSECP誘導體群をコードするポリヌクレオチド群を、mRNAプローブ群の作製のためのベクター類にクローニングする方法を含む。mRNAプローブ作製のためのベクターは当該分野で既知であり、市販されており、適切なRNAポリメラーゼ及び適切な標識されたヌクレオチドを加えることによって、*in vitro*でRNAプローブを合成するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーター基によって標識され得る。レポーター基の例としては、³²P又は³⁵S等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。

【0269】

SECPをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、SECPの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には細胞増殖異常、自己免疫/炎症疾患、心血管障害、神経障害、及び発達障害が含まれ、細胞増殖異常の中には日光角化症、動脈硬化、アテローム硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合性結合組織病（MCTD）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌など癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、及び子宮の癌が含まれ、自己免疫/炎症性の疾患の中には、後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病（慢性原発性副腎機能不全）、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィー（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球傷害因子性偶発性リンパ球減少症、新生児溶血性疾患（胎児赤芽球症）、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少性紫斑病、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、心血管障害の中には、鬱血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪部石灰化（mitral annular calcification）、僧帽弁逸脱、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心移植の合併症、動静脈瘤、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管系腫

10

20

30

40

50

瘍、血栓溶解の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術 (vascular replacement)、冠動脈バイパス移植術が含まれ、神経障害の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症 (色素性網膜炎)、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、プリオン病 (クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、及び Gerstmann-Straussler-Scheinker 症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管腫症 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、ダウン症を含む中枢神経系性精神遅滞及び他の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄疾患、筋ジストロフィー他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神障害 (気分性、不安性の障害、統合失調症 / 分裂病)、季節性感情障害 (SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、遅発性ジスキネジア、ジストニー、パラノイド精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核変性 (corticobasal degeneration)、及び家族性前頭側頭型痴呆とが含まれ、また発達障害も含まれ、その中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ / ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR 症候群 (ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神遅滞)、スミス マジェニス症候群 (Smith-Magenis syndrome)、骨髄異形成症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症や、シャルコーマリーツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症や、Sydenham 舞蹈病 (Sydenham's chorea) 及び脳性小児麻痺などの発作障害、二分脊椎、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感音難聴が含まれる。SECP をコードするポリヌクレオチド配列は、変容した SECP 発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用する、サザーン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術や、PCR法や、ディップスティック (dip stick)、ピン (pin)、及びマルチフォーマットの ELISA 式アッセイ、及びマイクロアレイに使用することが可能である。このような定性方法又は定量方法は、当分野で公知である。

10

20

30

【0270】

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

40

【0271】

SECP の発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロファイルが確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件下で、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、SECP をコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量で用いて行った実験から得た値を正常な被検体から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

【0272】

50

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

【0273】

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

【0274】

SECPをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断への利用には、PCRの利用が含まれ得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いは *in vitro* で産出し得る。オリゴマーは、好ましくはSECPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはSECPをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件下で、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェンシー条件下で、近縁のDNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

【0275】

或る特定態様で、SECPをコードするポリヌクレオチド群に由来のオリゴヌクレオチドプライマー類を用いて塩基多型(SNP)を検出し得る。SNPは、多くの場合にヒトの先天性又は後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定はされないがSNPの検出法は、SSCP (single-stranded conformation polymorphism: 一本鎖高次構造多型) と蛍光SSCP (fSSCP) がある。SSCPでは、SSCPをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)でDNAを増幅する。このDNAは例えば、患部組織又は正常組織、生検サンプル、体液などに由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などの高処理機器でアンプリマー(amplimer)の検出が可能になる。更に、インシリコSNP (in silico SNP, isSNP) と呼ばれる配列データベース分析法は、共通のコンセンサス配列へアセンブリされるような個々のオーバーラップするDNA断片群の配列を比較することにより、多型性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調製に、又は統計モデルとDNA配列クロマトグラムとの自動分析とを用いたシーケンシングのエラーに起因する配列変異を、フィルターリングして除去する。別の態様では、例えば高処理MASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0276】

SNPを利用して、ヒト疾患の遺伝的基礎を研究しうる。例えば少なくとも16種の一般的SNPが、インスリン非依存型糖尿病と関連している。SNPはまた、嚢胞性線維症、鎌状赤血球貧血、慢性肉芽腫症等の単一遺伝子病の転帰の違いを研究するために有用である。例えば、マンノース結合レクチンであるMBL2における変異体群は、嚢胞性線維症における有害な肺の転帰との相関が示されている。SNPはまた、薬理ゲノム学においても有用性を持つ。薬理ゲノム学は、患者の薬物への応答(例えば命を脅かす毒性)に影響する遺伝的変異体の同定を行う。例えばNアセチル転移酵素における或る変異は、抗結核薬であるイソニアジドに反応しての末梢ニューロパシーの高い発症率と関連する。一方、ALOX5遺伝子のコアプロモータにおける或る変異の結果、5-リポキシゲナーゼ経路を標的とする或る抗喘息薬での治療に対する臨床応答が低下する。異なる集団群におけるSNPの分布の分析は、遺伝的浮動、突然変異、遺伝子組換え、遺伝子選択の調査に有用であり、集団の起源とその移動との追跡にも有用である (Taylor, J.G. 他 (2001) Trends Mol. Med. 7:507-512, Kw

10

20

30

40

50

ok, P.-Y.及びZ. Gu (1999) Mol. Med. Today 5:538-543、Nowotny, P. 他(2001) Curr. Opin. Neurobiol. 11:637-641)。

【0277】

SECPの発現を定量するために用い得る別の方法の例としては、ヌクレオチド群の放射標識又はビオチン標識、対照核酸の共増幅 (coamplification)、及び、標準曲線から得た結果の補間もある (Melby, P.C 他(1993) J. Immunol. Methods 159:235-244、Duplaa, C. 他(1993) Anal. Biochem. 212:229-236)。当該のオリゴマー又はポリヌクレオチドが種々の希釈度で存在し、分光応答又は比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数サンプルの定量速度を加速できる。

【0278】

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

【0279】

別の実施例では、SECP、SECPの断片、SECPに特異的な抗体をマイクロアレイ上のエレメントとして用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質間相互作用、薬物-標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニター又は測定できる。

【0280】

或る実施態様は、或る組織又は細胞タイプの転写イメージを作製する、本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織又は細胞タイプによる、遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る (Seilhamer 他(1999) 米国特許第5,840,484号「Comparative Gene Transcript Analysis」は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。従って、特定の組織又は細胞タイプの転写物又は逆転写物全体に本発明のポリヌクレオチド又はその相補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを生成し得る。一実施態様では、本発明のポリヌクレオチド又はそれらの相補体が1マイクロアレイ上に複数エレメントの1サブセットを持つような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロファイルを提供するであろう。

【0281】

転写イメージは、組織、細胞株、生検、又は他の生体サンプルから単離した転写物を用いて作製し得る。転写イメージはしたがって、組織又は生検サンプルの場合には *in vivo*、細胞株の場合には *in vitro*での遺伝子発現を反映する。

【0282】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、*in vitro*モデル系及び医薬品の前臨床評価に、或いは工業的又は天然の環境化合物の毒性試験に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを標示し、しばしば分子フィンガープリント又は毒性シグネチャ (toxicant signatures) と称される、特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (Nuwaysir, E.F. 他(1999) Mol. Carcinog. 24:153-159; Steiner, S.及びN.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471)。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物のシグネチャと同様のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。フィンガープリント又はシグネチャは、多数の遺

10

20

30

40

50

伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合に、最も有用且つ精緻である。理想的には、ゲノム全域にわたる発現の測定が、最高品質のシグネチャを提供する。たとえ発現が任意の試験された化合物によって変容しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データをノーマライズするために使用できるため、それらの遺伝子も重要である。ノーマライズ手順は、種々の化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。或る毒性シグネチャのエレメント群に遺伝子機能を割り当てることは毒性機序の解釈に役立つが、毒性の予測につながる、シグネチャ群の統計的マッチングには、遺伝子機能の知識は必要でない(例えばNational Institute of Environmental Health SciencesのPress Release 00-02、2000年2月29日、http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxic_chip.htm参照)。したがって、毒性シグネチャを用いる中毒学的スクリーニングの際に、

10

【0283】

或る実施態様では、核酸を有する生体サンプルを試験化合物で処理することにより、この試験化合物の毒性を算定しうる。処理した生体サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1つ以上のプローブでハイブリダイズし、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写物レベルを定量し得る。処理した生体サンプル中の転写レベルを、無処理生体サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写物レベルの差は、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示す。

【0284】

別の実施態様は、本発明で開示するポリペプチド群を用いた、或る組織又は細胞タイプのプロテオームの分析に関する。プロテオームの語は、特定の組織又は細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更なる分析にかけることができる。プロテオーム発現パターンすなわちプロファイルは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数及び相対存在量を定量することにより分析する。したがって、或る細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織又は細胞タイプのポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施態様では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により、分離が達成される(前出Steiner及びAnderson)。タンパク質は、通常はクーマシーブルー、或いは銀染色液又は蛍光染色液などの物質を用いてゲルを染色することにより、分散した、独自の位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常、サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物又は治療薬で処理又は未処理のいずれかの生体サンプルからの、同等に位置したタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的又は酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。或るスポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を、当該のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列データが得られる。

20

30

【0285】

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

40

【0286】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写

50

レベルでの毒性シグネチャと並行に分析するべきである。いくつかの組織のいくつかのタンパク質については、転写物の存在量とタンパク質の存在量との相関が乏しいので (Anderson, N.L. 及び J. Seilhamer (1997) *Electrophoresis* 18:533-537)、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロファイルを変更するような化合物の分析において、プロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。更に、体液中の転写物の分析はmRNAの急速な分解のために困難なので、プロテオームのプロファイル作成はこのような場合により信頼でき、情報価値があり得る。

【0287】

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

【0288】

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

【0289】

マイクロアレイは、本技術分野で既知の方法で調製、使用し、分析しうる (Brennan, T.M. 他 (1995) 米国特許第5,474,796号、Schena, M. 他 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10614-10619、Baldeschweiler 他 (1995) PCT出願第W095/251116号、Shalon, D. 他 (1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. 他 (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2150-2155; Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、Schena, M 編集 (1999; DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, London)。

【0290】

本発明の別の実施例ではまた、SECPをコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製することが可能である。コード配列又は非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列より非コード配列の方が好ましい。例えば、多重遺伝子族のメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域又は人工染色体構成、例えばヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1構成、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J.J. 他 (1997) *Nat. Genet.* 15:345-355; Price, C.M. (1993) *Blood Rev.* 7:127-134; Trask, B.J. (1991) *Trends Genet.* 7:149-154)。一度マッピングすると、核酸配列群を用いて、例えば或る病状の遺伝を特定染色体領域の遺伝と又は制限酵素断片長多型 (RFLP) と関連させるような遺伝子連鎖地図を開発し得る (Lander, E.S. 及び D. Botstein (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7353-7357)。

【0291】

蛍光切片上ハイブリッド形成 (FISH) は、他の物理地図及び遺伝地図データと関連し得る (Heinz-Ulrich 他 (1995) in Meyers 前出 965-968 ページ)。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌或いは Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見られる。物理的な染色体地図上の SECP をコードする遺伝子の位置と、特定の疾患又は特定の疾患の素因との相関性は、この疾患と関連する DNA の領域の決定に役立ち得るため、ポジシ

10

20

30

40

50

ヨナルクロニングの作業を促進し得る。

【0292】

確定した染色体マーカー類を用いた連鎖解析などの物理的マッピング技術、及び染色体標本の切片上ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳類の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。この情報は、ポジショナルクロニングなどの遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探る研究者にとって価値がある。いったん疾患又は症候群に關与する遺伝子(群)が、血管拡張性失調症の11q22-23領域など、特定のゲノム領域へ遺伝連鎖によって大マーカーに限局されると、該領域にマップされる任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子或いは制御遺伝子を提示している可能性がある(Gatti, R.A.他(1988) Nature 336:577-580)。転座、反転などに起因する、健常者、保因者、罹病者の三者間における染色体位置の相違を検出する場合にも、本発明のヌクレオチド配列を用い得る。

10

【0293】

本発明の別の実施例では、SECP、その触媒作用断片或いは免疫原断片又はそのオリゴペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。薬物スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持体に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置しうる。SECPと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

【0294】

別の薬物スクリーニング技術は、当該のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる(Geysen他(1984) PCT出願W084/03564)。この方法においては、多数の様々な低分子の試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、SECP、或いはその断片と反応してから洗浄される。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合したSECPを検出する。精製したSECPはまた、上記した薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持体に固定することもできる。

20

【0295】

別の実施例では、SECPと特異結合可能な中和抗体がSECPとの結合について試験用化合物と競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。このようにして、SECPと1つ以上の抗原決定因子を共有するどのペプチドの存在をも、抗体を使って検出できる。

30

【0296】

別の実施例では、将来に開発される分子生物学技術が、現在知られているヌクレオチド配列の特性(限定はされないが、トリプレット遺伝コード、特異的な塩基対相互作用等を含む)に依存しているならば、SECPをコードするヌクレオチド配列をその新技術に用い得る。

【0297】

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

40

【0298】

前述した、及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、米国特許出願第60/326,945号、同第60/343,718号、同第60/343,980号、及び同第60/332,426号も含めて、言及することをもって本明細書の一部とする。

【実施例】

【0299】

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNA群の由来は、LIFESEQ GOLDデータベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA

50

)に記載されたcDNAライブラリ群である。幾つかの組織はホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネートに溶解し、他の組織はホモジナイズしてフェノールに又は変性剤群の好適な混合液に溶解した。混合液の1例であるTRIZOL (Invitrogen)は、フェノールとグアニジンイソチオシアネートとの一相溶液である。結果として得た溶解物は、塩化セシウムのクッション液の上に重層して遠心分離するか、クロロフォルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の慣例的方法で、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0300】

RNAの純度を高めるため、フェノールによるRNAの抽出及び沈殿を、必要な回数繰り返した。場合によっては、DNアーゼでRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T) 10
 連結常磁性粒子 (Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子 (QIAGEN, Chatsworth CA) 又はOLIGOTEX mRNA精製キット (QIAGEN) を用いて、ポリ(A)+RNAを単離した。別法では、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A) PURE mRNA精製キット (Ambion, Austin TX) を用いて、組織溶解物からRNAを直接単離した。

【0301】

場合によってはStratagene社にRNAを提供し、同社が、対応するcDNAライブラリ群を作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) 又はSUPERSCRIPトラスミドシステム (Invitrogen) を用いて本技術分野で既知の推奨方法又は類似の方法でcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した (前出Ausubel他、5章)。逆転写は、オリゴd(T) 又はランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを 20
 二本鎖cDNAに連結し、好適な制限酵素又は酵素群でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対しcDNAのサイズ選択 (300~1000bp) には、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2B又はSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィ (Amersham Biosciences)、或いは分取用アガロースゲル電気泳動法を用いた。cDNAは好適なプラスミドのポリリンカーの、適合する制限酵素部位にライゲーションした。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド (Stratagene)、PSPORT1プラスミド (Invitrogen) PCDNA2.1プラスミド (Invitrogen)、PBK-CMVプラスミド (Stratagene)、PCR2 - TOPOTAプラスミド (Invitrogen)、PCMV-ICISプラスミド (Stratagene)、pIGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE (Incyte Genomics)、又はpINCY (Incyte Genomics)、又はこれらの誘導体である。組換えプラスミドは、 30
 Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRF又はSOLR、或いはInvitrogen社のDH5、DH10B又はElectroMAX DH10Bなど適格な大腸菌細胞に形質転換した。

【0302】

2 cDNAクローンの単離

実施例1のようにして得たプラスミドの、宿主細胞からの回収は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いた *in vivo* 切除によって、或いは細胞溶解によって行った。プラスミドを精製する方法は、Magic又はWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A. L. Prep 96プラスミド精製キットの中から少なくとも1つを用いた。プラスミドは、沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥せずに4 で保管 40
 した。

【0303】

別法ではハイスループットフォーマットで直接結合PCRを用い、宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した (Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルをプロセスして384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素 (Molecular Probes, Eugene OR) 及びFLUOROSKAN II蛍光スキャナ (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) を用いて蛍光分析的に定量した。

【0304】

3 シークエンシング及び分析

実施例 2 に記載したようにプラスミド中に回収した Incyte cDNA を、以下に示すようにシーケンシングした。シーケンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えば ABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) 又は PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) を、HYDRA マイクロディスペンサー (Robbins Scientific) 又は MICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNA のシーケンス反応は、Amersham Biosciences 社が提供する試薬、又は ABI シーケンシングキット、例えば ABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) の試薬を用いて準備した。cDNA のシーケンス反応の電気泳動的分離と、標識したポリヌクレオチドの検出とは、MEGABACE 1000 DNA シーケンシングシステム (Amersham Biosciences) が、標準 ABI プロトコルとベースコーリングソフトウェアとを用いる ABI PRISM 373 又は 377 シーケンシングシステム (Applied Biosystems) が、或いはその他の本技術分野で既知の配列解析システムを用いた。cDNA 配列内のリーディングフレームは、標準的方法 (前出 Ausubel 他、7 章) を用いて同定した。いくつかの cDNA 配列を選択し、実施例 8 に開示する技術で配列を伸長させた。

10

【 0 3 0 5 】

Incyte cDNA に由来のポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ(A)配列を除去し、あいまいな塩基をマスクして検証した。その際、BLAST と、動的プログラミングと、隣接ジヌクレオチド分析 (dinucleotide nearest neighbor analysis) とに基づく、アルゴリズムとプログラムとを用いた。次に、Incyte cDNA 配列又はそれらの翻訳の問い合わせを、以下のデータベース群に対して行った。すなわち、選抜した公共のデータベース群 (例えば GenBank の霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM) と、ヒト、ラット、マウス、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 及び *Candida albicans* からの配列群を持つ PROTEOME データベース群 (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、及び、隠れマルコフモデル (HMM) ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、例えば PFAM、INCY、及び TIGRFAM (Haft, D.H. 他 (2001) *Nucleic Acids Res.* 29:41-43)、並びに HMM ベースのタンパク質ドメインデータベースたとえば SMART (Schultz, J. 他 (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857-5864; Letunic, I. 他 (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:242-244)。(HMM は、遺伝子ファミリーのコンセンサス 1 次構造を分析する確率的アプローチである。例えば、Eddy, S.R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365 を参照)。問い合わせは、BLAST、FASTA、BLIMPS、及び HMMER に基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA 配列をアセンブリし、完全長のポリヌクレオチド配列を産出した。或いは、GenBank cDNA 群、GenBank EST 群、ステッチされた配列群、ストレッチされた配列群、又は Genscan 予測コード配列群 (実施例 4 及び 5 を参照) を用い、Incyte cDNA のアセンブリ体群を完全長まで伸長させた。Phred と Phrap と Consed とに基づくプログラムを用いてアセンブリし、GenMark と BLAST と FASTA とに基づくプログラムを用いて、cDNA のアセンブリ体を、オープンリーディングフレームについてスクリーニングした。完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳し、対応する完全長ポリペプチド配列を得た。或いは、或るポリペプチドは、完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。完全長ポリペプチド配列群の続いた分析としての問い合わせを、GenBank タンパク質データベース群 (genpept)、SwissProt、PROTEOME データベース群、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM 及び Prosite 等のデータベースや、PFAM、INCY、及び TIGRFAM 等の隠れマルコフモデル (HMM) ベースのタンパク質ファミリーデータベース群、並びに SMART 等の HMM ベースのタンパク質ドメインデータベース群に対し行った。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PRO ソフトウェア (MiraiBio, Alameda CA) 及び LASERGENE ソフトウェア (DNASTAR) を用いて分析する。ポリヌクレオチドとポリペプチドとの配列アラインメントは、MEGALIGN マルチシーケンスアラインメントプログラム (DNASTAR) に組込まれた CLUSTAL アルゴリズムが指定する、デフォルトパラメータを用いて作製する。これは、アラインメントした配列間の一致率も計算する。

20

30

40

【 0 3 0 6 】

50

表7は、Incyte cDNAと完全長配列との分析とアセンブリとに用いたツールとプログラムとアルゴリズムとの概略と、適用可能な説明、参照文献、閾値パラメータを示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表7の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な参照文献であり、全ての文献の全体が、この参照により開示に含まれる。適用可能な場合には、列4は2つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す(スコアが高いほど、又は確率値が低いほど、2配列間の相同性が高くなる)。

【0307】

完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列のアセンブリ及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:33-64のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20～約4000ヌクレオチドの断片を表4の列2に示した。

10

【0308】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上の分泌タンパク質は、公共のゲノム配列データベース(例えば、gbpriやgbhtg)においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Genscanは汎用遺伝子同定プログラムであり、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する(Burge, C. 及び S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94、Burge, C. 及び S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354)。このプログラムは予測されたエキソン群を連結し、メチオニンから終止コドンに及ぶ、アセンブリされたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30 kbに設定した。これらのGenscan推定cDNA配列の内、どの配列が分泌タンパク質をコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドをPFAMモデルにおいて分泌タンパク質について問合せて分析した。潜在的な分泌タンパク質もまた、分泌タンパク質として注釈を付けたインサイトcDNA配列に対する相同性を基に同定した。これら選択したGenscan予測配列を、次にBLAST分析により、公共データベースgenpept及びgbpriと比較した。必要であれば、genpeptからのトップBLASTヒットと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分な又は省略されたエキソンなど、Genscanが予測した配列におけるエラーを補正した。BLAST分析はまた、Genscan予測配列の、いかなるIncyte cDNA又は公共cDNA適用範囲の発見にも用いられ、したがって転写の証拠を提供した。Incyte cDNAカバレッジが利用できた場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を補正又は確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に記載のアセンブリプロセスを用い、Incyte cDNA配列及び/又は公共cDNA配列でGenscan予測コード配列をアセンブリして得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は、編集後又は非編集のGenscan予測コード配列に、完全に由来する。

20

30

【0309】

5 cDNA配列データを使ったゲノム配列データのアセンブリ

《ステッチ配列(Stitched Sequence)》

部分cDNA配列群を伸長させるため、実施例4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムが予測したエキソン群を用いた。実施例3に記載したようにアセンブリした部分cDNA群を、ゲノムDNAにマッピングし、また、関連するcDNA群と、1つ以上のゲノム配列からGenscan予測されたエキソン群とを有するクラスター群に分解した。cDNAとゲノムとの情報を統合すべく、グラフ理論及び動的プログラミングに基づく或るアルゴリズムを用いて各クラスターを分析し、潜在的スプライス変異体群を生成した。配列群を続いて確認、編集又は伸長し、完全長配列を創出した。区間の全長が、2つ以上の配列に在るような配列区間群をクラスター内で同定し、そのように同定された区間群は、推移性により、等しいと考えた。例えば、或る区間が、1つのcDNAと2つのゲノム配列とに在る場合、3つの区間は全て等しいと考えた。このプロセスにより、無関係だが連続したゲノム配列群を、cDNA配列で結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列(parent sequence)に沿って現れる順にステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列及び変異

40

50

配列を作製する。1種類の親配列に沿って続く区間間の連鎖(cDNA - cDNA又はゲノム配列 - ゲノム配列)は、親の種類を変える連鎖(cDNA - ゲノム配列)より優先した。結果として得たスティッチ配列群を翻訳し、BLAST分析で公共データベースgenpept及びgbpriと比較した。Genscanが予測した不正確なエキソン群は、genpeptからのトップBLASTヒットとの比較により補正した。必要な場合、追加cDNA配列群を用いるかゲノムDNAの検査により、配列群を更に伸長させた。

【0310】

《ストレッチ配列(Stretched Sequence)》

部分DNA配列群を、BLAST分析に基づく1アルゴリズムで完全長まで伸長した。先ず、BLASTプログラムを用い、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物及び真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例3に記載のようにアセンブリした部分cDNAを問い合わせた。次に、最も近いGenBankタンパク質相同体を、BLAST分析により、Incyte cDNA配列又は実施例4に記載のGenScanエキソン予測配列のいずれかと比較した。得られた高スコアリングセグメント対(HSP)を用いてキメラ蛋白質を産出し、翻訳した配列をGenBank蛋白質相同体上にマッピングした。元のGenBankタンパク質相同体に対し、キメラタンパク質内では挿入又は欠失が起こり得る。GenBankタンパク質相同体、キメラタンパク質又はその両方をプローブとして用い、公共のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を検索した。このようにして、部分的なDNA配列を、相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。結果として得られるストレッチ配列を検査し、完全遺伝子を有するか否かを判定した。

【0311】

6 SECPをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:33-64をアセンブリするために用いた配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、Incyte LIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:33-64と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrapなどのアセンブリアルゴリズム(表7)を使用して、連続及びオーバーラップした配列のクラスターにアセンブリした。スタンフォード・ヒトゲノムセンター(SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所(WIGR)、Genethonなどの公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、いずれかのクラスター化された配列が既にマッピングされているかを判定した。マッピングされた配列が或るクラスターに含まれている場合、そのクラスターの全配列が、個々の配列番号と共に、地図上の位置に割り当てられた。

【0312】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲又は区間として表される。センチモルガン単位での或る区間の地図上の位置は、染色体の短腕(p-arm)の末端に対して測定する(センチモルガン(cM)は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1cMは、ヒトDNAの1メガベース(Mb)にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する)。cM距離は、各クラスター内に配列が含まれる放射線ハイブリッドマーカー類に対して境界を提供するGenethonによってマッピングされた遺伝マーカー群に基づく。NCBI「GeneMap'99」(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>)などの一般個人が入手可能なヒト遺伝子マップ及びその他の情報源を用いて、既に同定されている疾患遺伝子群が、上記した区間内若しくは近傍に位置するかを決定できる。

【0313】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン解析は遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験技術であり、特定の細胞種又は組織からのRNAが結合している或る膜への、標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを伴う(Sambrook及びRussell、前出、7章、Ausubel他、前出、4章)。

【0314】

類似の、BLASTを応用したコンピュータ技術を用いて、GenBankやLIFESEQ(Incyte Geno

10

20

30

40

50

mics)などのデータベースにおいて、同一又は関連分子を検索した。ノーザン分析は、多数の膜系ハイブリダイゼーションよりも非常に速い。更に、任意の特定の一致を厳密な或いは相動的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を修正できる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義する。

【0315】

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

5 × (長さ(配列1), 長さ(配列2))の最小値

10

【0316】

積スコアは、2つの配列間の類似度と、配列が一致する長さとの両方を考慮している。積スコアは、0~100のノーマライズされた値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。BLASTスコアを計算するには、或る高スコアリングセグメント対(HSP)内の一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不一致塩基に-4を割り当てる。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る(ギャップにより隔離される)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアのセグメント対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、断片的オーバーラップとBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えば積スコア100は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致する場合のみ得られる。積スコア70は、一端が100%一致し、70%オーバーラップしているか、他端が88%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。積スコア50は、一端が100%一致し、50%オーバーラップしているか、79%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。

20

【0317】

或いは、SECPをコードするポリヌクレオチドを、由来する組織に対して分析する。例えば幾つかの完全長配列は、少なくとも一部は、オーバーラップするIncyte cDNA配列群を用いてアセンブリする(実施例3を参照)。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、以下の臓器/組織カテゴリーの1つに分類される。すなわち心血管系、結合組織、消化器系、胎児構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液及び免疫系、肝、筋骨格系、神経系、脾臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性/混合性又は尿路である。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患/条件カテゴリー、すなわち癌、細胞株、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、プール、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。得られるパーセンテージは、SECPをコードするcDNAの組織特異的及び疾患特異的な発現を反映する。cDNA配列及びcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース(Incyte Genomics, Palo Alto CA)から得ることができる。

30

【0318】

8 ポリヌクレオチドをコードするSECPの伸長

40

完全長ポリヌクレオチドを、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマー群を用いて該断片を伸長させ産生する。或るプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、別のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマー群の設計にはOLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)或いは別の適切なプログラムを用い、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上となつて約68~約72の温度で標的配列にアニーリングするようにした。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチド群の伸長は、全て回避した。

【0319】

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

50

【0320】

高忠実度の増幅を当業者に周知の方法でのPCRで得た。PCRはPTC-200サーマルサイクラー(MJ Research, Inc.)での96穴プレートで行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200nmolの各プライマーを有する。また、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と2-メルカプトエタノールを含む反応バッファー、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Biosciences)、ELONGASE酵素(Invitrogen)、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94 , 3分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 60 , 1 分、ステップ 4: 68 , 2 分、ステップ 5: ステップ2、3及び 4を20回反復する。ステップ6: 68 、 5 分、ステップ7: 4 で保存する。別法では、プライマーの組、T7とSK+に対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94 , 3分、

10

【0321】

各ウェルのDNA濃度は、 $1 \times TE$ 及び $0.5 \mu l$ の希釈していないPCR産物に溶解した $100 \mu l$ のPICOGREEN定量試薬(0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR)を不透明な蛍光光度計プレート(Corning Costar, Acton MA)の各ウェルに分配し、DNAが試薬と結合できるようにして判定した。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量すべく、プレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンした。反応混合物のアリコート $5 \sim 10 \mu l$ を1%アガロースゲル上で電気泳動法によって解析し、どの

20

【0322】

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

30

【0323】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Biosciences)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。ステップ1: 94 , 3分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 60 , 1 分、ステップ 4: 72 , 2 分、ステップ 5: ステップ2、3及び 4を29回反復する。ステップ6: 72 、 5 分、ステップ7: 4 で保存する。上記のようにPICOGREEN試薬(Molecular Probes)でDNAを定量した。DNA回収率が低いサンプルは、上記同一条件で再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMICエネルギー移動シーケンシングプライマー、及びDYENAMIC

40

【0324】

同様に、上記手順を用いて完全長ポリヌクレオチドを検証した。或いは、完全長ポリヌクレオチドを用い、上記手順で、そのような伸長のために設計したオリゴヌクレオチド類と、或る適切なゲノムライブラリとを用いて5'調節配列を得た。

【0325】

9 SECPをコードするポリヌクレオチドの一塩基多型の同定

1 塩基多型(SNP)として知られる一般的なDNA配列変異体が、SEQ ID NO:33-64におい

50

て、LIFESEQデータベース (Incyte Genomics) を用いて同定された。同じ遺伝子からの配列群は共にクラスター化され、実施例 3 に述べたようにアセンブリされて、その遺伝子における全ての配列変異体の同定を可能にした。一連のフィルターからなるアルゴリズムを使って、SNPを他の配列変異体から区別した。前段フィルターは、最小限Phredクオリティスコア15を要求することにより大多数のベースコールのエラーを除去し、また、配列アライメントエラーや、ベクター配列、キメラ及びスプライス変異体の不適当なトリミングにより生じるエラーを取り除いた。染色体の高度解析の自動化手順により、推定SNPの近傍におけるオリジナルのクロマトグラムファイルが解析された。クローンエラーフィルターは統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、逆転写酵素、ポリメラーゼ、又は体細胞突然変異によって引き起こされるエラーのような、実験処理時に導入されるエラーを識別した。クラスターエラーフィルターは、統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、近縁の相同体又は偽遺伝子のクラスター化に起因するエラー、又は非ヒト配列によるコンタミネーションにより生じたエラーを同定した。最後のフィルター群によって、免疫グロブリン又はT細胞受容体に存在する重複 (duplicates) とSNPが除去された。

10

【 0 3 2 6 】

幾つかのSNPは、更なる特徴付けの為に選択された。選択は高処理MASSARRAYシステム (Sequenom, Inc.) を用いた質量分析によって行い、4群の異なるヒト集団におけるSNP部位での対立遺伝子頻度を分析した。白人集団は92個体 (46名の男子、46名の女子) からなり、83名はユタ出身、4名はフランス人、3名はベネズエラ人、2名はアーミッシュの人々である。アフリカ集団は194個体 (97名の男子、97名の女子) からなり、全員がアフリカ系アメリカ人である。ヒスパニック集団は324個体 (162名の男子、162名の女子) からなり、全員がメキシコのヒスパニックである。アジア集団は126個体 (64名の男子、62名の女子) からなり、報告された親の内訳は43%が中国人、31%が日本人、13%がコリアン、5%がベトナム人、8%が他のアジア人である。対立遺伝子頻度の分析は先ず白人集団においてなされ、幾つかの場合、SNPの内、対立遺伝子変異をこの集団において示さなかったSNPは、更に他の3集団においてテストされることは無かった。

20

【 0 3 2 7 】

1 0 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用

SEQ ID NO:33-64から導き出されたハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、又はゲノムDNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても本質的に同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、[-³²P]アデノシン3リン酸 (Amersham Biosciences) 250 µCiと、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを混合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストラン ビーズカラム (Amersham Biosciences) を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba I又はPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの、典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分10⁷カウントの標識されたプローブを有するアリコットを用いる。

30

40

【 0 3 2 8 】

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

【 0 3 2 9 】

1 1 マイクロアレイ

或るマイクロアレイ上でのアレイエレメント群の接続又は合成は、フォトリソグラフィ

50

、ピエゾ式印刷（インクジェット印刷、前出のBalteschweiler他などを参照）、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生した技術を用いて達成し得る。上記各技術において基板は、均一な、無孔の表面を持つ固体とすべきである(Schena, M., 編集 (1999) DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, London)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウェハがある。或いは、ドットプロット法又はスロットプロット法に類似した手順を利用し、熱的、紫外線的、化学的又は機械的結合手順を用いて基板の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、利用可能な、当業者に公知の方法と機械とを用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る(Schena, M. 他(1995) *Science* 270:467-470; Shalon, D.他(1996) *Genome Res.* 6:639-645; Marshall, A. 及び J. Hodgson (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:27-31)。

【0330】

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

【0331】

《組織又は細胞サンプルの調製》

総RNAを組織サンプルから単離するためグアニジニウムチオシアネート法を用い、ポリ(A)⁺RNA精製にオリゴ(dT)セルロース法を用いる。各ポリ(A)⁺RNAサンプルを、MMLV逆転写酵素、0.05pg/ μ lのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1 \times 第一鎖合成バッファー、0.03unit/ μ lのRNアーゼ阻害因子、500 μ MのdATP、500 μ MのdGTP、500 μ MのdTTP、40 μ MのdCTP、40 μ MのdCTP-Cy3(BDS)又はdCTP-Cy5(Amersham Biosciences)を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット(Incyte Genomics)を用い、200ngのポリ(A)⁺RNAを含む体積25mlで行う。特異的対照ポリ(A)⁺RNAは、非コード酵母ゲノムDNAからin vitro転写により合成する。37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした後、各反応サンプル(1つはCy3、もう1つはCy5標識)は、2.5mlの0.5M水酸化ナトリウムで処理、85 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプル精製には、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム(Clontech, Palo Alto CA)を用いる。混合後、2つの反応サンプルをエタノール沈殿させるため、1mlのグリコーゲン(1mg/ml)、60mlの酢酸ナトリウム、及び300mlの100%エタノールを用いる。サンプルは次に、SpeedVAC(Savant Instruments Inc., Holbrook NY)を用いて乾燥して仕上げ、14 μ lの5 \times SSC/0.2%SDS中で再懸濁する。

【0332】

《マイクロアレイの調製》

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを作製する。各アレイエレメントは、クローン化したcDNAインサート群と、ベクター群とを含む細菌細胞群から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートに隣接するベクター配列群に相補的なプライマー類を用いる。30サイクルのPCRで1~2ngの初期量から5 μ gより大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅したアレイエレメントは、SEPHACRYL-400(Amersham Biosciences)を用いて精製する。

【0333】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕

微鏡スライドガラス (Corning) は、0.1%のSDS及びアセトン中で超音波洗浄し、処理の間及び処理後に十分に蒸留水で洗浄する。スライドガラスは、4%フッ化水素酸 (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA) 中でエッチングし、十分に蒸留水中で洗浄し、95%エタノール中で0.05%アミノプロピルシラン (Sigma) を用いてコーティングする。コーティングしたスライドは、110 °Cのオーブンで硬化させる。

【0334】

米国特許第5,807,522号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。この特許に引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度100 ng/ μ lのアレイエレメントDNA1 μ lを、高速ロボット装置 (robotic apparatus) により、開放型キャピラリープリンティングエレメント (open capillary printing element) に充填する。該装置はここで、スライド毎に約5 nlのアレイエレメントサンプルを置く。

【0335】

マイクロアレイに、STRATALINKER UVクロスリンク機 (Stratagene) を用いてUV架橋する。マイクロアレイは、室温において0.2% SDSで1度洗浄し、蒸留水で3度洗浄する。非特異結合部位をブロックするため、マイクロアレイのインキュベートをリン酸緩衝食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) 中に0.2% カゼイン、60 °Cで30分間行った後、前記のように0.2% SDS及び蒸留水で洗浄する。

【0336】

《ハイブリダイゼーション》

ハイブリダイゼーション反応に用いる9 μ lのサンプル混合体には、Cy3又はCy5で標識したcDNA合成産物群の各0.2 μ gを、5 \times SSC, 0.2% SDSハイブリダイゼーション緩衝液中に含む。サンプル混合体は、65 °Cまで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上へ等分して1.8cm²のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きい空洞を有する防水チャンバーに移す。チャンバー内を湿度100%に保つため、140 μ lの5 \times SSCをチャンバーの1コーナーに加える。アレイを入れたチャンバーは、60 °Cで約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中 (1 \times SSC, 0.1% SDS) において45 °Cで10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中 (0.1 \times SSC) において45 °Cで10分間ずつ3回洗浄して乾燥させる。

【0337】

《検出》

レポーター標識したハイブリダイゼーション複合体を検出するには、Cy3の励起のために488 nm、Cy5の励起のために632 nmでスペクトル線を発生し得るInnova70混合ガス10Wレーザー (Coherent, Inc., Santa Clara CA) を備えた顕微鏡を用いる。励起レーザー光の焦点をアレイ上に置くため、20 \times 顕微鏡対物レンズ (Nikon, Inc., Melville NY) を用いる。アレイを有するスライドを、顕微鏡の、コンピュータ制御のX-Yステージに置き、対物レンズを通してラスタースキャンする。本実施例で用いる1.8 cm \times 1.8 cmのアレイは、解像度20 μ mでスキャンする。

【0338】

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

【0339】

通常、各スキャンの感度を較正するため、cDNA対照種を或る既知濃度でサンプル混合体に添加し、対照種が発生するシグナル強度を用いる。アレイ上の或る特定の位置には或る相補DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度をハイブリダイゼーション種の

10

20

30

40

50

重量比1:100,000と相関させる。異なる源泉(例えば代表的な試験細胞及び対照細胞など)からの2つのサンプルを、各々異なるフルオロフォアで標識し、異なる発現をする遺伝子群を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、較正するcDNAのサンプルを2種のフルオロフォアで標識し、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えることによって較正を行う。

【0340】

電子増倍管の出力をデジタル化するため、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールした12ビットRTI-835Hアナログデジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いる。デジタル化したデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラースケールへのリニア20色変換を用いて、シグナル強度がマッピングされたイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なるフルオロフォアを同時に励起及び測定する場合には、各フルオロフォアの発光スペクトルを用いて、データは先ずフルオロフォア間の光学的クロストーク(発光スペクトルの重りに起因する)を補正される。

【0341】

グリッドが蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルが次に統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEMTOOLS遺伝子発現分析プログラム(Incyte Genomics)である。発現の変化が少なくともほぼ2倍、シグナルとバックグラウンドの割合が少なくとも2.5、及び少なくとも40%のエレメントのスポットサイズを示すアレイエレメントは、差次的発現を示すとされる。

【0342】

《発現》

例えば、SEQ ID NO:47の発現は他の脳組織に比べると、アルツハイマー病に罹患している後方帯状脳組織において増加している。61才の正常女性の脳からの特定の切開脳領域を、軽度のアルツハイマー病に罹患している脳と、また、二人の正常男性の脳の切開領域と比較した。軽度のアルツハイマー病の診断は認定された神経病理学者によって確立され、脳全体にわたる複数区分の顕微鏡的検査に基づいている。したがってSEQ ID NO:47はアルツハイマー病の診断と治療に有用である。

【0343】

他の実施例では、SEQ ID NO:48の発現は、インターフェロン- γ で処理した乳管癌細胞で、未処理の細胞に比べて減少している。T-47D乳癌細胞株は、浸潤性乳管癌を持つ或る54才の女性から得た胸水から単離された。T-47D細胞は200 ng/mlのインターフェロン- γ で1、4、8、24、48時間、及び3日間処理した。これらの処理された細胞を未処理の細胞と比較した。したがって、SEQ ID NO:48は乳管細胞の癌の診断及び治療に有用である。

【0344】

他の実施例において、乳癌に關与する分子的現象を理解するために、正常乳房組織と癌性乳房組織の遺伝子発現のパターンを比較した。43才の女性ドナーからの乳房葉癌組織でのSEQ ID NO:53は、同じドナーの肉眼的に見て關与しない正常乳房組織と比べて、少なくとも2分の1に下方制御されていることがわかった。それ故、SEQ ID NO:53は乳癌の検出試験に使用することができる。

【0345】

別の例でSEQ ID NO:62は正常骨芽細胞に対して骨肉腫に罹患した骨芽細胞において差次的発現を示し、これはマイクロアレイ分析で判定した。正常ヒト骨芽細胞(初代培養、NH0 st 5488)からのmRNAを生検検体、骨肉腫組織、初代培養組織、又は転移組織からのmRNAと比較した。一つの細胞懸濁液中の約 2.0×10^6 個の細胞をT75フラスコに植え付け、同じものを二個ないし三個用意した。細胞株は1:6~8の比で平均6~8日毎に継代培養した。SEQ ID NO:62の発現は正常骨芽細胞に比べて、検査した腫瘍組織の16の中14において少なくとも三分の一に減少した。したがってSEQ ID NO:62は、骨肉腫のモニタリング、治療及び診断アッセイにおいて有用である。

【0346】

他の実施例では、SEQ ID NO:62の発現は、79才（女性）の卵巣腺癌患者ドナーの正常組織に比べて、同ドナーの卵巣腫瘍では少なくとも2分の1に減少した。マッチさせた正常及び腫瘍形成性の卵巣組織サンプルは、Huntsman Cancer Institute, (ハンツマン癌研究所、Salt Lake City, UT)によって提供されている。従ってSEQ ID NO:62は、卵巣癌の診断アッセイ及び病期分類アッセイに、また卵巣治療における潜在的な生体マーカー及び治療薬として有用である。

【0347】

他の実施例において、SEQ ID NO:62は非老化前駆細胞 (non-senescent progenitor) のPrEC細胞 (継代3)に対して、老化(継代8)及び前老化(継代7)では差次的発現を示した。正常ドナーから単離された初代前立腺上皮細胞は、至適成長培養液中70-80%コンフルエンスまで成長させ、収集した。SEQ ID NO:62の発現は非老化細胞に比べて、老化細胞及び前老化細胞において少なくとも4倍増加した。したがってSEQ ID NO:62は、癌の診断マーカーとして、又は潜在的治療標的として有用である。

10

【0348】

1.2 相補的ポリヌクレオチド

SECPをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然のSECPの発現を検出、低下、又は阻害するために用いられる。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも、本質的に同じ手順を用いる。Oligo4.06ソフトウェア (National Biosciences) 及びSECPのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いて、プロモーターがコード配列に結合するのを防止する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがSECPをコードする転写物に結合するのを阻害する。

20

【0349】

1.3 SECPの発現

SECPの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でSECPが発現するために、抗生物質耐性遺伝子及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターとしては、lacオペレーター調節エレメントと併用するT5又はT7バクテリオファージプロモーター、及びtrp-lac (tac) ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21 (DE3) などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド (IPTG)で誘発されるとSECPを発現する。真核細胞でのSECPの発現は、昆虫細胞株又は哺乳動物細胞株に一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多角体病ウイルス (AcMNPV)の組換え型を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須の多角体遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、SECPをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強力なポリヘドリンプロモーターによって高レベルのcDNA転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合は夜蛾の1種 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) 昆虫細胞への感染に用いるが、ヒト肝細胞への感染に用いることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスへの更なる遺伝的修飾が必要になる (Engelhard, E.K 他、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V.他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945)。

30

40

【0350】

殆どの発現系では、SECPが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、又はFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く1回で行うことができる。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化したグルタチオン上での融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Biosciences)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でSECPからタンパク質分解的

50

に切断できる。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いた免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂上での精製を可能にする (Q IAGEN)。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel他(前出、10及び16章)に記載がある。これらの方法で精製したSECP を直接用いて以下の実施例 17、18、及び19のアッセイを行うことができる。

【0351】

14 機能的アッセイ

SECP機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのSECPをコードする配列の発現によって評価する。cDNAを高いレベルで発現する強いプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにcDNAをサブクローニングする。選択されるベクターとしては、PCMV SPORTプラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA) 及びPCR 3.1プラスミド (Invitrogen) があり、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを持つ。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5~10 μ gの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来又は造血由来の細胞株に、一過的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1~2 μ gのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、組換えベクターからのcDNA発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64又はCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFP又はCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、それらの細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、ヨウ化プロビジウムによるDNA染色によって計測される核DNA含量の変化、前方散乱光と90°側方散乱光によって計測される細胞サイズと粒度の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変容、及びフルオレセイン抱合したアネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変容とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M.G. (1994; Flow Cytometry, Oxford, New York NY) に記述がある。

【0352】

遺伝子発現におけるSECPの影響は、SECPをコードする配列とCD64又はCD64-GFPのどちらかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64又はCD64-GFPは、形質移入された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG (IgG) の保存された複数の領域に結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる (DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。SECP及び目的の他の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0353】

15 SECPに特異的な抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE; Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 182:488-495を参照) 又は他の精製技術を用いて実質上精製されたSECPを用いて、標準的なプロトコルで動物 (例えばウサギ、マウスなど) を免疫化して抗体を作り出す。

【0354】

或いは、レーザーGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてSECPアミノ酸配列を解析し、免疫原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。例えばC末端付近或いは隣接する親水性領域等の、適切なエピトープの選択については、当分野で公知である (前出のAusubel, 他 11章)。

10

20

30

40

50

【0355】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、Fmocケミストリを用いるABI 431Aペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) との反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫原性を高める (前出Ausubel他)。完全フロイントアジュバントにおいて、オリゴペプチド-KLH複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗SECP活性を検査するには、ペプチド又はSECPを基板に結合し、1%BSAを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0356】

16 特異的抗体を用いる天然SECPの精製

天然SECP或いは組換えSECPを、SECPに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSE (Amersham Biosciences) のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗SECP抗体とを共有結合させることにより形成する。結合後に、製造者の使用説明書に従ってこのレジンをブロックし、洗浄する。

【0357】

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

【0358】

17 SECPと相互作用する分子の同定

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

【0359】

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

【0360】

SECPは又はイスルーブットな方法で酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス (CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、遺伝子の2大ライブラリにコードされる遺伝子間の全ての相互作用を決定することができる (Nandabalan, K. 他(2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0361】

18 SECP活性の実証

SECPの成長刺激活性若しくは成長阻害活性のアッセイでは、スイスマウス3T3細胞におけるDNA合成の量を測定する (McKay, I. 及び Leigh, I., 編集 (1993) Growth Factors: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, NY)。このアッセイにおいては、SECPの量の変更が、放射性DNA前駆物質である [³H]チミジンの存在中で静止状態3T3培養細胞へと加えられる。このアッセイのためのSECPを得る手段は、組換えでも良く、生化学的な調製より得ても良い。酸不溶性DNAへの [³H]チミジンの取込を適切な時間間隔で測定し、取込量は、新規に合成されたDNAの量に正比例する。少なくとも1000倍のSECP濃度範囲にわたる線形の用量 応答曲線は、成長の調節活性を示す。ミリリットルあたりの活性の一つのユニットは、50%の応答レベルを提供するSECPの濃度として定義される。ここで、100%の応答レベルは、酸-沈殿可能DNAへの [³H]チミジンの

10

20

30

40

50

最大の混合を示している。

【0362】

別法では、SECP活性のためのアッセイで、培養細胞中の神経伝達の刺激若しくは抑制を測定する。培養CHO繊維芽細胞をSECPに曝す。エンドサイトーシスによるSECP取込後に、これらの細胞を新鮮培養液で洗浄し、細胞全膜電位を固定したアフリカツメガエル筋細胞を操作して、SECPを含まない媒質中で前記の繊維芽細胞の1つと接触させる。膜電流を、この筋細胞から記録する。対照値に対し増加若しくは減少した電流は、SECPの神経修飾性効果を示している (Morimoto, T.他 (1995) (1995) Neuron 15:689696)。

【0363】

別法では、SECP活性のアッセイで、分泌性の膜で囲まれた細胞小器官におけるSECPの量を測定する。上述したように形質移入された細胞を採取し、溶解する。ライセートは、当業者に既知の、ショ糖密度勾配超遠心法などの方法で分画する。そのような方法は、ゴルジ体、ER、小膜結合小胞、及びその他の分泌細胞小器官のような、細胞内要素の隔離を可能とする。分割された細胞ライセート及び全体の細胞ライセートよりの免疫沈降は、SECP特定抗体を用いて実行され、また免疫沈降サンプルはSDS-PAGE及び免疫プロット技術を用いて解析される。分画した細胞ライセートと全細胞ライセートはSECP特異的抗体群を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降したサンプルをSDS-PAGEと免疫プロット法で分析する。全細胞ライセート中のSECPに対する分泌性細胞小器官中のSECP濃度は、分泌経路を通るSECPの量に比例する。

10

【0364】

別法では、AMP結合活性の測定を、SECPと³²P標識したAMPとを混合させて行う。この反応溶液を37℃でインキュベートし、反応はトリクロロ酢酸の添加で終了させる。酸抽出物を中和し、ゲル電気泳動にかけて非結合標識を除去する。ゲル内に留まる放射活性が、SECPの活性に比例する。

20

【0365】

19 免疫グロブリン活性の実証

SECP活性の或るアッセイでは、SECPが血清からの抗原類を認識し沈殿させる能力を測定する。この活性の測定は、定量沈降反応で成し得る (Golub, E. S. 他 (1987) Immunology: A Synthesis, Sinauer Associates, Sunderland, MA, 113-115ページ)。SECPを、当分野で既知の方法で同位体標識する。一定量の標識SECPに種々の血清濃度を加える。SECP-抗原複合体を溶液から沈殿させ、遠心分離で収集する。沈殿性SECP-抗原複合体の量は、沈殿物中に検出される放射性同位元素の量に比例する。沈殿性SECP-抗原複合体の量を、血清濃度に対してプロットする。多様な血清中濃度に対しての特徴的沈降素曲線が得られ、沈殿性SECP-抗原複合体の量は、初め血清中濃度の増加に比例して増加し、当量点を頂点とし、その後は血清中濃度の増加に比例して減少する。このように、沈殿性SECP-抗原複合体の量は、抗原の制限量と過剰量の両方に対する感受性によって特徴付けられるSECP活性の測定量である。

30

【0366】

別法として、SECP活性の或るアッセイは、細胞表面におけるSECPの発現を測定する。SECPをコードするcDNAを、非白血球細胞株に形質移入する。細胞表面タンパク質は、ビオチンで標識する (de la Fuente, M.A. 他 (1997) Blood 90:2398-2405)。SECP特異的抗体群を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降したサンプルをSDS-PAGEと免疫プロット法で分析する。標識した免疫沈降剤と未標識免疫沈降剤の比は、細胞表面に発現したSECPの量に比例する。

40

【0367】

別法で、SECP活性の或るアッセイは、SECPの過剰発現が誘発する、細胞凝集の量を測定する。このアッセイにおいては、NIH3T3などの培養細胞にSECPをコードするcDNAで形質移入する。このcDNAは、或る強力なプロモーターの制御下にある或る適切な哺乳類発現ベクター内に含まれるようにする。緑色蛍光タンパク質 (CLONTECH) などの蛍光標識タンパク質をコードするcDNAとの共形質移入を行うと、安定な形質移入体を同定するのに役立つ。

50

形質移入された細胞と形質移入されない細胞で細胞の凝集（塊化）量を比較する。細胞の凝集量が、SECPの活性の直接の測定値となる。

【0368】

当業者には、本発明の範囲及び趣旨から逸脱しない限りの、記載した本発明の、組成物、方法及びシステムの、種々の修正及び変更については自明であろう。本発明が、新規かつ有用なタンパク質群及びそれらをコードするポリヌクレオチド群を提供し、これらを創薬過程に利用しうることを、また本発明が、これらの組成を用いた、疾患と病態との検出、診断、及び治療の方法を提供することは理解されよう。本発明について説明するにあたり幾つかの実施態様に関連して説明を行ったが、本発明の請求の範囲が、そのような特定の実施態様に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。このような実施態様の記載は完全であると考慮されるべきでなく、また本発明を開示したとおりの形態に限定するものでもない。更に、1つの実施態様の要素は、他の1つ以上の実施態様の要素と容易に組み換え得る。このような組み合わせにより、本発明の範囲にある多数の実施態様を形成し得る。本発明の範囲は、添付した請求の範囲及びそれらの等価物によって規定されるよう意図される。

10

【0369】

（表の簡単な説明）

表1は、本発明の完全長のポリヌクレオチド実施態様及びポリペプチド実施態様の命名の概略である。

【0370】

表2は、本発明のポリペプチド実施態様のGenBank識別番号と、最も近いGenBank相同体の注釈(annotation)と、PROTEOMEデータベース識別番号と、PROTEOMEデータベース相同体群の注釈とを示す。また、各ポリペプチドとその相同体（1つ以上）が一致する確率スコアも併せて示す。

20

表3は、予測されるモチーフ及びドメインなど、ポリペプチド実施態様の構造的特徴を、ポリペプチドの分析に用いた方法、アルゴリズム及び検索可能なデータベースと共に示す。

【0371】

表4は、ポリヌクレオチド実施態様をアセンブリするために用いたcDNAやゲノムDNA断片を、該ポリヌクレオチドの選択された断片と共に示す。

30

【0372】

表5は、ポリヌクレオチド実施態様の代表的cDNAライブラリを示す。

【0373】

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

【0374】

表7は、ポリヌクレオチドとポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、参照文献及び閾値パラメータと共に示す。

【0375】

【表 1 - 1】

表 1 - 1

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID No:	Incyte ポリペプチド ID	ポリスクレオチド SEQ ID No:	Incyte ポリスクレオチド ID	Incyte 全長クローン
1915726	1	1915726CD1	33	1915726CB1	90125327CA2, 90125411CA2, 90205540CA2, 90207955CA2, 90208540CA2, 90208548CA2, 90208608CA2, 90208616CA2, 90132981CA2, 90133057CA2, 90133065CA2, 90133081CA2
3822072	2	3822072CD1	34	3822072CB1	
7340485	3	7340485CD1	35	7340485CB1	
7500806	4	7500806CD1	36	7500806CB1	
7500807	5	7500807CD1	37	7500807CB1	
7975166	6	7975166CD1	38	7975166CB1	7975166CA2, 90208804CA2, 90208820CA2, 90208920CA2
2013270	7	2013270CD1	39	2013270CB1	
222833	8	222833CD1	40	222833CB1	
3728182	9	3728182CD1	41	3728182CB1	
7500859	10	7500859CD1	42	7500859CB1	
7675437	11	7675437CD1	43	7675437CB1	90147353CA2, 90147461CA2, 90147477CA2
1854688	12	1854688CD1	44	1854688CB1	
2118273	13	2118273CD1	45	2118273CB1	
7500897	14	7500897CD1	46	7500897CB1	90197004CA2, 90197128CA2, 90197251CA2, 90197259CA2, 90197267CA2, 90197275CA2, 90197351CA2, 90197359CA2, 90197375CA2, 90197391CA2
7502575	15	7502575CD1	47	7502575CB1	
7500178	16	7500178CD1	48	7500178CB1	90019643CA2, 90147401CA2, 90147409CA2, 90188644CA2, 90188720CA2,
4303692	17	4303692CD1	49	4303692CB1	

10

20

30

40

【表 1 - 2】

表 1 - 2

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID	Incyte 全長クローン
7500228	18	7500228CD1	50	7500228CB1	90188736CA2, 90188744CA2
7500492	19	7500492CD1	51	7500492CB1	90052963CA2
7500910	20	7500910CD1	52	7500910CB1	90025953CA2, 90025961CA2, 90025993CA2, 90026061CA2, 90026069CA2
7188209	21	7188209CD1	53	7188209CB1	90176710CA2, 90176734CA2, 90176834CA2, 90177054CA2, 90177062CA2, 90177078CA2, 90177086CA2, 90177094CA2, 90213626CA2, 90213634CA2, 90213642CA2
7502299	22	7502299CD1	54	7502299CB1	
7503072	23	7503072CD1	55	7503072CB1	6579080CA2
6978750	24	6978750CD1	56	6978750CB1	95034876CA2, 95034892CA2, 95034992CA2, 95058135CA2, 95058159CA2, 95058227CA2, 95058243CA2, 95058335CA2, 95058367CA2, 95058403CA2, 95058483CA2
7499506	25	7499506CD1	57	7499506CB1	
7503595	26	7503595CD1	58	7503595CB1	
7504539	27	7504539CD1	59	7504539CB1	8125147CA2
1740257	28	1740257CD1	60	1740257CB1	90167173CA2, 90167265CA2, 90167281CA2, 90167282CA2, 90167289CA2
7233657	29	7233657CD1	61	7233657CB1	7233657CA2
7503434	30	7503434CD1	62	7503434CB1	90020576CA2, 90124509CA2

10

20

30

40

【 0 3 7 7 】

【表 1 - 3】

表 1 - 3

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID	Incyte 全長クローン
278182	31	278182CD1	63	278182CB1	278182CA2
7505738	32	7505738CD1	64	7505738CB1	

10

20

30

40

表 2 - 1

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
1	1915726CD1	g4519541	3.80E-132	[マウス] スロムボスポンジタンパク質 1 ドメイン
7	2013270CD1	g14039845	1.10E-139	[ヒト] 精巣発達関連 (testes development-related) NYD- SP18
8	222833CD1	g1478205	8.40E-73	[マウス] PNG タンパク質 (Lagercrantz, J. 他 (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 223 (2), 335-340)
14	7500897CD1	598558 FLJ105 81	6.40E-52	[ヒト] [転移酵素] RNA メチルトランスフェラーゼファミリーのメン バー。RNA メチルトランスフェラーゼファミリーは RNA にてリボ ス基の 2'-O-メチル化を触媒する。
15	7502575CD1	321910 Reps1	3.40E-06	[マウス] [小分子結合タンパク質] [細胞質; 細胞骨格] GTP 分解酵素 活性化タンパク質の Ral 結合タンパク質 1 に結合するタンパク 質、アダプタータンパク質 Grb2 および Crk と会合し、EGF 受容体 と複合体を形成し、EGF 受容体の活性化によってチロシンリン酸 化される。
		689457 R144.4	6.70E-06	[線虫] 出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) の VPR1 (細胞骨格組織および細胞 増殖に関与するプロリンリッチタンパク質 verprolin) に弱い類似性 を有するタンパク質。
		8968 LAS17	3.60E-05	[出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>)] [複合アセンブリタンパク質] [細胞骨 格] 皮質アクチン (cortical actin) 細胞骨格の構成成分
16	7500178CD1	g12653521 427577 CL2508 4	4.10E-18 9.20E-140	[ヒト] 骨肉腫において増幅されたものに類似 [ヒト] OS-9 の領域に低類似性の領域を有する、未知の機能のタン パク質。OS-9 はヒト肉腫に関連する酸性の可溶性タンパク質であ る。
		428204 OS-9	4.40E-19	[ヒト] ヒトの組織に普遍的に発現される酸性溶解性タンパク質。 対応する遺伝子の増幅はヒト肉腫と関連している。
		245656 F48E8.45.50E-11		[線虫] 未知の機能のタンパク質。肉腫 (Hs.76228) で発現が増幅さ れるタンパク質である、ヒトの OS-9 に N 末端で弱い類似性を有す る。

【表 2 - 2】

表 2 - 2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
17	4303692CD1	g13183795	4.40E-124	[ヒト]CMF(シヤルコー・マリー・トウース病)複製領域転写物1 (noue K, 他(2001) Genome Res. 11:1018-1033)
18	7500228CD1	709607 C17OR F1A g12276052 658456 Y71F9 B.8 346456 KJAA0 644 343446 GAC1	2.10E-126 2.40E-29 2.10E-30 1.40E-26 5.70E-25	[ヒト]タンパク質-タンパク質相互作用を仲介するWDドメイン (WD-40リピート)含有タンパク質。血小板活性化因子アセチルヒ ドロラーゼサブユニットの領域に低類似性を有する。 [線虫] 1D304 [線虫] 線虫 sym-5 に中等度の類似性を有するタンパク質 (ロイシ ンリッチリピート(LPR)タンパク質ファミリの推定メンバー、mec- 8で合成的に致死的 (synthetically lethal)) [ヒト]C末端ロイシンとシステインリッチドメインを含む、ロイ シンリッチリピート含有タンパク質 [ヒト][受容体(シグナル伝達)]ロイシンリッチリピートスーパー ファミリのメンバー、細胞接着とシグナル伝達受容体に類似性を有 する。遺伝子は悪性神経腫において増幅され、過剰発現され る。 [ヒト][調節サブユニット; 構造性タンパク質; 活性化因子; ヒド ロラーゼ; プロテアーゼ(プロテアソーム以外)]血漿メタロプロテ アーゼカルボキシペプチダーゼN(キニナーゼ1)の大きな調節ユ ニット; ホルモンは二つの触媒的サブユニットと二つの調節サブユ ニットで構成される。
		347488 CPN2	6.90E-24	

10

20

30

40

表 2 - 3

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
19	7500492CD1	339770 CHAD g14250355 249675 T04F3.22.30E-09 720063 Isra_ 719916 Inub_A 717205 lbmo_ A 332880 Sparc	1.60E-23 1.10E-81 2.60E-07 2.50E-06 8.40E-06 1.10E-05	[ヒト][アドヘシン (Adhesin)/アグルチニン][細胞外基質(角質および基底膜);基底膜(細胞外基質);細胞外(細胞壁を除く)]コンドロアドヘリン(Chondroadherin)、細胞結合特性を有する、軟骨の細胞外基質タンパク質。ロイシンリッチリピートを有し、システインリッチでもある。 [ヒト]分泌性モジュラーカルシウム結合タンパク質 1 [線虫]ヒト Hs.82733 に弱い類似性を有するタンパク質(nidogen-2 のヒト mRNA) [タンパク質データベース] Sparc [タンパク質データベース]基底膜タンパク質 Bm-40 [タンパク質データベース] Bm-40 [ラット][小分子結合タンパク質][細胞外基質(角質と基底膜)]オステオネクチン(osteonectin)、コラーゲン基質成分、ヒト SPARC に強い類似性を有する。ヒト SPARC は骨でのミネラル化の開始に関与する。 [ヒト]ナチュラルキラー細胞転写物 4 (Dahl,C.A.,他 (1992) J. Immunol. 148:597-603) [ヒト][細胞外(細胞壁を除く)]細胞接着に関与し得る RGD モチーフを有するタンパク質。白血球によって発現され、細胞分裂活性化 T 細胞および IL-2 で処理された NK 細胞において上方制御される
20	7500910CD1	g14424787 623570 NK4	1.60E-119 2.30E-120	

10

20

30

40

表 2 - 4

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリ ペプチド ID	GenBank ID NO: または PROTEOME ID NO:	確率スコア	注釈
23	7503072CD1	598476 FLJ104 77	1.80E-18	[ヒト] [活性化因子] PRKRIR の領域に低類似性の領域を有する。PRKRIR は、PKR インヒビター P58IPK(PKRRI) と結合し、またこれを阻害して、インターフェロン誘導性プロテインキナーゼ PKR(PKRRI) 活性を制御する。 [fl] [ヒト] メタロホスホエステラーゼ (Vuoristo, J.T. 他 (2001) Cytogenet. Cell Genet. 95 (1-2), 60-63) [ヒト] [活性化因子] PRKRIR の領域に低類似性の領域を有する。PRKRIR は、PKR インヒビター P58IPK(PKRRI) と結合し、またこれを阻害して、インターフェロン誘導性プロテインキナーゼ PKR(PKRRI) 活性を制御する。
25	7499506CD1	g19880267	1.00E-116	[ヒト] ヒト PRKRIR の領域に中等度の類似性領域を有する。PRKRIR は、PKR 調節因子 P58IPK (ヒト DNAJC3) と結合し、またこれを阻害して、インターフェロン誘導性プロテインキナーゼ PKR(ヒト PRKR) 活性を制御する。
27	7504539CD1	598476 FLJ104 77	9.40E-23	[ヒト] [活性化因子] PRKRIR の領域に低類似性の領域を有する。PRKRIR は、PKR インヒビター P58IPK(PKRRI) と結合し、またこれを阻害して、インターフェロン誘導性プロテインキナーゼ PKR(PKRRI) 活性を制御する。
28	1740257CD1	g12002046	2.00E-70	[f1] [ヒト] 脳 my050 プロテイン
29	7233657CD1	697466 FLJ139 54	1.10E-38	[ヒト] タンパク質はヒト AD7C-NTP の領域に高い類似性の領域を有する。ヒト AD7C-NTP はアルツハイマー病患者の脳で過剰発現される神経細胞 thread タンパク質である。 [ヒト] ロイシンリッチリビートタンパク質。S 型神経芽細胞で発現される。
30	7503434CD1	342682 P37NB	7.80E-65	[ヒト] ロイシンリッチ神経タンパク質 (Glockner, G. 他. (1998) Genome Res. 8 (10), 1060-1073)
32	7505738CD1	g3135309 344528 LRN 424166 KIAA1 016	0.0 0.0 5.20E-114	[ヒト] ロイシンリッチ神経細胞タンパク質 [ヒト] アクチンと結合するカルボニン相同体 (CH) ドメインを含むタンパク質、タンパク質間相互作用を仲介するロイシンリッチピートを含む。ヒト LRN ロイシンリッチ神経細胞タンパク質に中等度の類似性を有する。

【表 3 - 1】

表 3 - 1

SEQ ID NO:	Incyte ペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
1	1915726	CD1 263	S20 S33 S57 S160 N137 S172 S232 S239 T176 T196 T200 Y119	S20 S33 S57 S160 N137	signal_cleavage: M1-S20 シグナルペプチド: M1-T15, M1-S20, M1-G23, M1-L17 トロンボスポンジンタイプ1 ドメイン: S151-C206 P 値: 7.5e-3	SPSCAN HMMER HMMER_PFAM
2	3822072	CD1 74	T16		signal_cleavage: M1-S18 シグナルペプチド: M1-S18 ピンキユリンファンミアミリシグネチャ: Q20-F70	SPSCAN HMMER PROF ILESCAN
3	7340485	CD1 157	S112 S147 T104 T146		シグナルペプチド: M1-C22	HMMER
4	7500806	CD1 113	S52 T7	N94	signal_cleavage: M1-A39 シグナルペプチド: M17-A32, M17-T36, M17-V38, M17-S41, M17-D40 細胞質内ドメイン: V38-P113 膜貫通ドメイン: E15-Y37 非サイトソル内ドメイン: M1-N14	SPSCAN HMMER TMHMMER
5	7500807	CD1 110	S52 T7	N91	signal_cleavage: M1-A39 シグナルペプチド: M17-A32, M17-T36, M17-V38, M17-S41, M17-D40 細胞質内ドメイン: V38-P110 膜貫通ドメイン: E15-Y37 非サイトソル内ドメイン: M1-N14	SPSCAN HMMER TMHMMER

10

20

30

40

表 3 - 2

SEQ ID NO:	Incyte ペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
6	7975166CD1	134	S25 T122		アミノシル転移 RNA 合成酵素 クラス I シグネチャ: A39-C88	PROFILESCAN
					signal_cleavage: M1-G21	SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-G16, M1-A19, M1-G21, M1-P24	HMMER
7	2013270CD1	262	S39 S188 S191 S192 S202 S206 S207 T86 T88 T122 T167 T197 T225 Y92	N47 N138 N200	signal_cleavage: M1-G45	SPSCAN
8	222833CD1	147	T57		signal_cleavage: M1-G22 シグナルペプチド: M1-G22 タンパク質 LIM A PKC 増強化 PP1 ホスホ リパーゼ C の阻害性 隣接 PD025745: G25-K147	SPSCAN HMMER BLAST_PRODOM
9	3728182CD1	280	S9 S57 S122 S127 N78 N85 N92 S136 S159 S257 T34 T81 T94 T177	N120	Signal_cleavage: M1-A53	SPSCAN
10	7500859CD1	183	S168 T58 T70 T85		Signal_cleavage: M1-G25 シグナルペプチド: M1-A18, M1-L20, M1-G23, M1-G25, M1-A27 リボソームタンパク質 L32e シグネチャ: N71-H151	SPSCAN HMMER PROFILESCAN

10

20

30

40

表 3 - 3

SEQ ID NO:	Incyte ポリアミノ酸ペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
11	7675437CD1	198	S18 S69 S78 S118N76 S139 S186 T153 T188		Signal_cleavage: M1-A33	SPSCAN
12	1854688CD1	199	S54 S99 S157	N155	DENN (AEX-3) ドメイン: M1-N90 タンパク質 シナプス前作用の調節因子 セリン プロテアーゼ インヒビター RAB3 GDP/GTP PD008900: M1-K116 シグナルペプチド: M1-A15	HMMER HMMER_PFAM BLAST_PROD0M
13	2118273CD1	226	S22 T218	N90 N216	Signal_cleavage: M1-A42 シグナルペプチド: M1-G27, M1-P24	SPSCAN HMMER
14	7500897CD1	110	S66 S85 T86		Signal_cleavage: M1-A21 シグナルペプチド: M1-R28	SPSCAN HMMER
15	7502575CD1	276	S23 S166 S170 S175 S222 S223 S231 S241 T18 T44 T131 T135 T156	N265	Signal_cleavage: M1-G24	SPSCAN
16	7500178CD1	429	S86 S114 S200 S219 S225 S317 T85 T230 T273 T340 T353 T370 T377 T418		Signal_cleavage: M1-G29, M1-A33	SPSCAN
					タンパク質 F7N22.4 OS9 前駆体シグナル PD033854: E102-P247, W297-C413	BLAST_PROD0M

10

20

30

40

【表 3 - 4】

表 3 - 4

SEQ ID NO:	Incyte ペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
17	4303692CDI1243	S74 S92 S112 S121 S155 T165 T180	N225		グラム陽性球菌 表面タンパク質 '固着' へ キサペプチド: L54-V59 Signal_cleavage: M1-N18	SPSCAN
18	7500228CDI1307	S103 S281 S283 T39 T65 T119 Y130	N101 N117 N273		シグナルペプチド: M1-G18, M1-G20, M1-C30, M1-C24 ロイシンリッチリピート: G77-A100, N217-R239, R125-D148, N101-R124, G240-A264, R149-P169, A265-P288, R170-A192, N193-R216, D53-P76 ロイシンリッチリピート N 末端ドメイン: G23-P51	HMMER HMMER_PFAM HMMER_PFAM
19	7500492CDI1163	S13 S55 S80 S98 S104 S146 T30 T87 T134	N103		ロイシンリッチリピートシグネチャ PR00019: L78-L91, L168-L181 糖タンパク質 ホルモン受容体 DM02997 P35376 4-202:G23-N158 (P 値 =4.4e-10) ロイシンジッパーパターン: L197-L218 Signal_cleavage: M1-A67	BLIMPS_PRINTS BLAST_DOMO MOTIFS SPSCAN

【表 3 - 5】

表 3 - 5

SEQ ID NO:	インサイトペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
20	7500910CD1 222		S34 S80 S137 S188 S220		EF-ハンドカルシウム-結合ドメイン: D101- M113, D138-L150 Signal_cleavage: M1-A67	SPSCAN
21	7188209CD1 177		S19 S43 S73 S120N146 S127 T50 T131		シグナルペプチド: M11-A31, M11-T38, M11-A35 ナチュラルキラー細胞タンパク質 4 前駆体 シグナル PD116715: M1-K222 細胞接着配列: R204-D206 signal_cleavage: M1-A16	HMMER BLAST_PRODOR MOTIFS SPSCAN
22	7502299CD1 278		S5 S59 S99 S198 N18 N202 S210 S217 T20 T64 T84 T88 T137 Y195		シグナルペプチド: M1-A16 シグナルペプチド: M1-S19 signal_cleavage: M1-S60	HMMER HMMER SPSCAN
23	7503072CD1 577		S11 S32 S66 S141N9 N355 N465 S193 S204 S217 S241 S327 S351 S375 S381 S401 T88 T100 T120 T154 T174 T211 T308 T475 T492 T540 T571 T576		signal_cleavage: M1-R13	SPSCAN

10

20

30

40

【表 3 - 6】

表 3 - 6

SEQ ID NO:	Incyte ペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
------------	----------------	---------	-----------	-------------	---------------------	--------------

ドメイン EGF 様 プロテオーム 完全 糖タンパク質 III C28H8.5 FIS システイン B2235_C1_177 PD021355: G440-L568 類似性 EGF 様ドメイン タンパク質 F21A3.3 BLAST_PRODOM C52G5.2 C28H8.5 染色体 III T28H10.2 PD013474; T475-V575

24	6978750CD1	197	S2 S181 T129 T185	N19 N26 N145	signal_cleavage: M1-A23	SPSCAN
シグナルペプチド: M1-G29						
サイトゾル内ドメイン: H85-S197 膜貫通ドメイン: L62-I84						
非サイトゾル内ドメイン: M1-T61						

25	7499506CD1	220	S20 S21 S59 S127 S180 S185 S214 T57 T64 T168		M1-A32	SPSCAN
サイトゾル内ドメイン: M1-S20 膜貫通ドメイン: S21-Y43						
非サイトゾル内ドメイン: L44-D220						
ヘモペキシン ドメイン シグネチャ: L92-MOTIFS L106						

10

20

30

40

【表 3 - 7】

表 3 - 7

SEQ ID NO:	Incyte ポリアミド ID 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
26	7503595CD1 626	S147 S241 S245 S285 S292 S322 S327 S429 S498 S536 S558 S559 S563 S599 S600 T18 T42 T71 T255 T276 T279 T353 T373 T398 T404 T461 T617	N40 N60 N347 N514	signal_cleavage: M1-G25	SPSCAN
27	7504539CD1 548	S11 S66 S141 S193 S204 S217 S241 S322 S346 S352 S372 T88 T100 T120 T154 T174 T211 T279 T446 T463 T511 T542 T547	N9 N326	signal_cleavage: M1-R13	SPSCAN

ドメイン EGF 様 プロテオーム 完全 糖タンパク質 III C28H8.5 FIS システイン B2235_C1_177 PD021355: G411-L539 類似性 EGF 様ドメイン タンパク質 F21A3.3 BLAST_PRODOR C52G5.2 C28H8.5 染色体 III T28H10.2 PD013474: T446-V546

表 3 - 8

SEQ ID NO:	Incyte ペプチド ID	ポリアミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
28	1740257CD1	121	S111 T10 T68 T104		signal_cleavage: M1-P45	SPSCAN
29	7233657CD1	76		N52	signal_cleavage: M1-G65	SPSCAN
30	7503434CD1	134	S22 S25 S42 S118 T95		signal_cleavage: M1-A15	SPSCAN
31	278182CD1	131	S34		P37NB PD080375; M1-K106 signal_cleavage: M1-A64	BLAST_PRODOM SPSCAN
32	7505738CD1	832	S50 S160 S167 S183 S309 S313 S317 S325 S391 S392 S432 S457 S520 S606 S623 S768 S793 S810 T71 T196 T370 T631 T637 T789	N48 N112 N120 N315	signal_cleavage: M1-G13	SPSCAN

ロインリッチレポート:
 S160-S182, S183-P205, A115-P137, S92-T114,
 L138-G159, L206-R227, H228-K249, D69-V91
 細胞質内ドメイン: T676-R832
 膜貫通ドメイン: L653-V675
 非サイトゾル内ドメイン: M1-P652
 カルボニニアミリリピータンパク質
 BL01052; L560-I585, L598-T637

HMMER_PFAM

TMHMMER

BLIMPS_BLOCKS

【表 3 - 9】

表 3 - 9

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
					ロイシンリッチ神経細胞タンパク質 PD183144: G202-P557	BLAST_PROD0M
					ロイシンリッチ神経細胞タンパク質 PD179337: L628-R832	BLAST_PROD0M
					ロイシンリッチ神経細胞タンパク質 PD172998: G12-A115	BLAST_PROD0M
					カルボニンファミリリピート DM01491P41737 I-124: Q533-Q629	BLAST_DOM0

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表 4 - 1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列長	配列断片
33/1915726CB1/ 2949	1-932, 42-829, 51-920, 71-904, 71-926, 71-936, 163-1131, 168-1131, 218-1131, 305-1131, 326-1131, 443-569, 443-609, 443-614, 443-619, 443-698, 443-732, 443-742, 443-770, 443-781, 443-793, 443-860, 443-876, 443-886, 443-890, 443-925, 443-930, 443-936, 443-955, 443-967, 443-974, 443-983, 443-996, 443-1031, 443-1121, 443-1239, 443-1254, 443-1330, 476-1274, 520-1315, 525-1347, 529-1131, 534-1321, 538-1327, 639-1286, 665-1268, 766-1389, 815-1435, 845-1625, 1000-1618, 1003-1734, 1007-1614, 1233-1872, 1284-1763, 1284-1766, 1286-1362, 1319-1560, 1319-1740, 1319-1764, 1319-2066, 1373-2056, 1374-1885, 1387-1756, 1392-1989, 1400-1721, 1400-1756, 1453-2167, 1539-2066, 1548-1718, 1729-2507, 1753-2390, 1756-2521, 1783-2502, 1794-2511, 1820-2056, 1920-2502, 2089-2546, 2144-2546, 2176-2466, 2180-2695, 2212-2449, 2225-2549, 2349-2949, 2353-2546
34/3822072CB1/ 495	1-448, 109-495, 180-448, 199-451
35/7340485CB1/ 940	1-738, 1-940, 3-588, 28-693, 296-940, 332-940, 472-695, 489-695, 492-937
36/7500806CB1/ 1812	1-174, 4-204, 5-204, 19-299, 31-288, 31-1812, 49-148, 59-271, 204-366, 204-474, 204-760, 211-475, 217-861, 482-742, 497-752, 497-1096, 518-662, 525-712, 532-788, 547-858, 575-844, 594-857, 608-967, 609-945, 621-825, 621-826, 623-907, 635-1179, 643-1299, 643-1333, 643-1368, 644-980, 645-939, 671-934, 672-1286, 681-946, 688-959, 690-954, 699-965, 701-1237, 724-1213, 745-958, 757-965, 759-1302, 768-1200, 777-899, 779-985, 782-1458, 788-1080, 796-949, 798-1031, 810-1014, 814-1245, 818-1126, 818-1330, 818-1336, 818-1423, 823-1131, 831-1081, 831-1085, 845-1085, 863-1192, 870-1093, 870-1432, 877-1452, 890-1151, 896-1132, 929-1181, 929-1216, 930-1176, 930-1207, 930-1497, 931-1202, 931-1217, 931-1473, 934-1195, 938-1175, 940-1226, 948-1252, 949-1196, 954-1229, 954-1285, 960-1454, 966-1252, 966-1254, 971-1701, 982-1676, 984-1532, 990-1573, 1002-1534, 1002-1542, 1002-1543, 1002-1567, 1013-1353, 1014-1290, 1019-1715, 1021-1455, 1021-1456, 1028-1799, 1038-1761, 1039-1317, 1039-1335, 1039-1347, 1050-1288, 1050-1304, 1052-1583, 1055-1532, 1066-1475, 1074-1661, 1082-1213, 1089-1674, 1091-1336, 1091-1342, 1091-1346, 1099-1617, 1102-1340, 1102-1644, 1105-1395, 1105-1445, 1109-1622, 1121-1791, 1124-1406, 1126-1374, 1126-1383, 1131-1561, 1133-1673, 1140-1812, 1149-1317, 1152-1388, 1153-1376, 1154-1403, 1154-1448, 1156-1623, 1160-1401, 1160-1439, 1162-1687, 1163-1396, 1163-1408, 1171-1812, 1174-1488, 1174-1812, 1176-1371, 1176-1789, 1179-1463, 1180-1797, 1185-1801, 1191-1477, 1192-1320, 1192-1400, 1195-1414, 1203-1564, 1203-1757, 1204-1744, 1205-1794, 1212-1433, 1213-1752, 1216-1499, 1219-1481, 1219-1772, 1219-1789, 1221-1446, 1233-1503, 1233-1617, 1235-1457, 1236-1792, 1238-1497, 1242-1788, 1247-1452, 1247-1467, 1269-1541, 1274-1682, 1288-1550, 1297-1812, 1298-1544, 1307-1512, 1307-1764, 1308-1247

【表 4 - 2】

表 4 - 2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	1812, 1310-1812, 1311-1812, 1317-1800, 1329-1806, 1340-1763, 1340-1788, 1345-1809, 1346-1801, 1349-1622, 1350-1533, 1355-1798, 1358-1794, 1358-1801, 1358-1810, 1363-1800, 1366-1801, 1366-1812, 1371-1800, 1372-1801, 1377-1606, 1377-1801, 1378-1806, 1379-1617, 1379-1804, 1382-1801, 1383-1806, 1388-1812, 1390-1801, 1402-1686, 1407-1792, 1414-1674, 1414-1793, 1414-1811, 1418-1800, 1420-1800, 1425-1661, 1426-1674, 1429-1812, 1436-1797, 1442-1800, 1455-1799, 1456-1799, 1469-1663, 1479-1808, 1481-1776, 1486-1801, 1494-1798, 1520-1752, 1521-1799, 1540-1790, 1540-1798, 1540-1811, 1541-1723, 1548-1780, 1548-1791, 1548-1806, 1550-1796, 1552-1772, 1558-1800, 1569-1781, 1573-1800, 1573-1801, 1576-1804, 1577-1801, 1578-1801, 1582-1757, 1585-1812, 1586-1801, 1587-1732, 1589-1800, 1598-1801, 1604-1800, 1624-1801, 1670-1812, 1700-1794, 1708-1801, 1720-1801

37/7500807CB1/ 1803	1-174, 4-204, 5-204, 19-299, 31-288, 31-1803, 49-148, 59-271, 204-366, 204-461, 204-751, 211-458, 217-852, 459-733, 459-794, 488-743, 488-1087, 509-653, 516-703, 523-779, 538-849, 566-835, 585-848, 599-958, 600-936, 612-816, 612-817, 614-898, 626-1170, 634-1290, 634-1324, 634-1359, 635-971, 636-930, 662-925, 663-1277, 672-937, 679-950, 681-945, 690-956, 692-1228, 715-1204, 736-949, 748-956, 750-1293, 759-1191, 768-890, 770-976, 773-1449, 779-1071, 787-940, 789-1022, 801-1005, 805-1236, 809-1117, 809-1321, 809-1327, 809-1414, 814-1122, 822-1072, 822-1076, 836-1076, 854-1183, 861-1084, 861-1423, 868-1443, 881-1142, 887-1123, 920-1172, 920-1207, 921-1167, 921-1198, 921-1488, 922-1193, 922-1208, 922-1464, 925-1186, 929-1166, 931-1217, 939-1243, 940-1187, 945-1220, 945-1276, 951-1445, 957-1243, 957-1245, 962-1692, 973-1667, 975-1523, 981-1564, 993-1525, 993-1533, 993-1534, 993-1558, 1004-1344, 1005-1281, 1010-1706, 1012-1446, 1012-1447, 1019-1790, 1029-1752, 1030-1308, 1030-1326, 1030-1338, 1041-1279, 1041-1295, 1043-1574, 1046-1523, 1057-1466, 1065-1652, 1073-1204, 1080-1665, 1082-1327, 1082-1333, 1082-1337, 1090-1608, 1093-1331, 1093-1635, 1096-1386, 1096-1436, 1100-1613, 1112-1782, 1115-1397, 1117-1365, 1117-1374, 1122-1552, 1124-1664, 1131-1803, 1140-1308, 1143-1379, 1144-1367, 1145-1394, 1145-1439, 1147-1614, 1151-1392, 1151-1430, 1153-1678, 1154-1387, 1154-1399, 1162-1803, 1165-1479, 1165-1803, 1167-1362, 1167-1780, 1170-1454, 1171-1788, 1176-1792, 1182-1468, 1183-1311, 1183-1391, 1186-1405, 1194-1555, 1194-1748, 1195-1735, 1196-1785, 1203-1424, 1204-1743, 1207-1490, 1210-1472, 1210-1763, 1210-1780, 1212-1437, 1224-1494, 1224-1608, 1226-1448, 1227-1783, 1229-1488, 1233-1779, 1238-1443, 1238-1458, 1260-1532, 1265-1673, 1279-1541, 1288-1803, 1289-1535, 1298-1503, 1298-1755, 1299-1803, 1301-1803, 1302-1803, 1308-1791, 1320-1797, 1331-1754, 1331-1779, 1336-1800, 1337-1792, 1340-1613, 1341-1524, 1346-1789, 1349-1785, 1349-1792, 1349-1801, 1354-1791, 1357-1792, 1357-1792, 1357-1792
------------------------	---

【 0 3 9 3 】

【表 4 - 3】

表 4 - 3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	1803, 1362-1791, 1363-1792, 1368-1597, 1368-1792, 1369-1797, 1370-1608, 1370-1795, 1373-1792, 1374-1797, 1379-1803, 1381-1792, 1393-1677, 1398-1783, 1405-1665, 1405-1784, 1405-1802, 1409-1791, 1411-1791, 1416-1652, 1417-1665, 1420-1803, 1427-1788, 1433-1791, 1446-1790, 1447-1790, 1460-1654, 1470-1799, 1472-1767, 1477-1792, 1485-1789, 1511-1743, 1512-1790, 1531-1781, 1531-1789, 1531-1802, 1532-1714, 1539-1771, 1539-1782, 1539-1797, 1541-1787, 1543-1763, 1549-1791, 1560-1772, 1564-1791, 1564-1792, 1567-1795, 1568-1792, 1569-1792, 1573-1748, 1576-1803, 1577-1792, 1578-1723, 1580-1791, 1589-1792, 1595-1791, 1615-1792, 1661-1803, 1691-1785, 1699-1792, 1711-1792
38/7975166CBI/ 2314	1-982, 266-963, 275-951, 275-954, 275-1124, 278-1167, 285-989, 285-1115, 286-1101, 287-917, 292-985, 295-1107, 295-1175, 301-1116, 303-602, 303-906, 303-1101, 304-745, 304-871, 304-880, 304-911, 304-917, 304-982, 304-1000, 305-1095, 306-944, 306-1067, 307-1079, 320-1237, 338-535, 345-535, 350-1099, 356-1193, 384-1182, 412-971, 415-1101, 426-1186, 459-1098, 460-1296, 560-1334, 591-1454, 718-1289, 725-1368, 725-1402, 863-1567, 981-1350, 981-1527, 982-1574, 1002-1766, 1143-1986, 1403-2078, 1416-2085, 1463-2085, 1502-1540, 1502-1542, 1587-2032, 1592-2314, 1597-1679, 1639-1679
39/2013270CBI/ 1747	1-123, 1-333, 1-453, 1-1747, 22-333, 25-333, 36-333, 43-333, 53-333, 95-333, 166-333, 331-1198, 469-891, 782-1023, 782-1257, 808-1322, 889-992, 917-1312, 924-1534, 936-1559, 955-1187, 955-1295, 955-1516, 973-1511, 973-1518, 979-1605, 980-1189, 1025-1235, 1026-1285, 1027-1607, 1251-1618, 1259-1617, 1297-1744, 1305-1675, 1319-1747, 1389-1636, 1390-1615, 1418-1618, 1436-1618

【表 4 - 4】

表 4 - 4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
40/222833CBI/ 1426	1-467, 8-560, 14-169, 14-183, 14-237, 14-347, 14-356, 14-361, 14-380, 14-392, 14-393, 14-398, 14-402, 14-409, 14-414, 14-427, 14-428, 14-434, 14-445, 14-454, 14-462, 14-470, 14-478, 14-479, 14-489, 14-500, 14-517, 14-526, 14-533, 14-558, 14-579, 14-584, 14-602, 14-637, 14-639, 21-637, 22-593, 23-541, 26-461, 27-424, 30-513, 30-637, 34-629, 35-334, 35-353, 35-411, 35-458, 35-477, 35-614, 35-618, 36-548, 38-582, 39-438, 40-340, 45-541, 66-630, 72-309, 90-637, 95-639, 97-630, 102-637, 115-612, 138-530, 152-620, 156-363, 156-406, 160-618, 161-388, 166-381, 171-591, 172-552, 174-464, 174-637, 176-411, 178-637, 179-637, 180-404, 181-637, 182-411, 182-425, 182-637, 183-631, 183-637, 184-637, 185-512, 186-637, 187-637, 191-478, 191-637, 192-637, 193-637, 195-479, 195-637, 196-468, 196-487, 196-637, 197-637, 198-637, 199-637, 200-544, 200-550, 200-554, 200-637, 201-637, 202-457, 202-637, 202-670, 203-637, 205-637, 206-456, 206-637, 207-637, 208-635, 208-637, 209-637, 210-447, 210-489, 210-637, 211-637, 212-470, 213-637, 214-637, 215-591, 215-637, 220-476, 220-482, 220-506, 220-561, 220-588, 220-637, 221-637, 222-620, 223-457, 223-637, 224-482, 224-637, 225-637, 226-439, 226-444, 226-486, 226-637, 230-400, 230-440, 230-483, 230-637, 233-637, 234-637, 235-529, 236-615, 236-637, 237-488, 239-637, 240-411, 241-637, 242-614, 242-620, 243-637, 246-637, 248-528, 248-637, 249-505, 249-637, 250-557, 250-637, 251-637, 252-535, 252-637, 253-428, 253-637, 254-637, 255-620, 255-637, 256-530, 257-533, 257-637, 259-440, 259-637, 260-637, 261-517, 261-637, 262-501, 262-609, 262-637, 263-516, 263-637, 264-616, 264-637, 265-637, 266-575, 267-637, 269-620, 269-637, 271-637, 272-591, 273-517, 274-558, 274-637, 275-537, 275-637, 277-457, 277-637, 279-637, 280-521, 281-523, 283-639, 285-637, 287-470, 289-637, 291-637, 294-637, 296-637, 297-637, 298-637, 300-582, 302-637, 305-604, 309-637, 310-330, 310-335, 310-514, 310-566, 310-606, 310-637, 311-619, 314-514, 314-637, 321-606, 325-575, 328-637, 335-637, 346-559, 350-632, 350-637, 351-637, 352-620, 353-637, 360-591, 364-571, 372-635, 377-637, 378-584, 380-605, 387-637, 398-637, 401-619, 410-635, 420-629, 424-637, 431-637, 432-618, 443-637, 451-637, 477-637, 490-637, 493-637, 551-637, 578-635, 593-637, 635-1016, 635-1341, 666-791, 672-1368, 678-992, 678-997, 678-1018, 678-1055, 678-1059, 678-1067, 678-1071, 678-1084, 678-1094, 678-1107, 678-1110, 678-1115, 678-1119, 678-1120, 678-1121, 678-1126, 678-1128, 678-1133, 678-1136, 678-1143, 678-1144, 678-1145, 678-1148, 678-1154, 678-1156, 678-1158, 678-1159, 678-1161, 678-1163, 678-1164, 678-1166, 678-1167, 678-1169, 678-1170, 678-1171, 678-1172, 678-1173, 678-1174, 678-1176, 678-1178, 678-1183, 678-1185, 678-1187, 678-1195, 679-1055, 679-1067, 679-1152, 679-1156, 679-1190, 680-1191, 681-1117, 681-1350, 683-1163, 684-1177, 685-1034, 686-938, 686-1034, 686-1118, 686-1146, 686-1281, 687-1114, 687-1144, 687-1182, 688-971, 688-1276, 689-918, 690-1388, 691-926, 691-1092, 691-1144, 691-1209, 691-1269, 691-1399, 694-1154, 694-1171, 696-818, 696-1019, 696-1055, 696-1067, 696-1073, 696-1098, 696-1100, 696-1105, 696-1116, 696-1117, 696-1130, 696-1144, 696-1149, 696-1152, 696-1156, 696-1173, 697-1123, 697-1154.

【 0 3 9 5 】

10
20
30

【表 4 - 5】

表 4 - 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	697-1392, 698-1186, 699-1161, 700-1274, 701-1218, 702-1160, 703-959, 705-1105, 705-1155, 707-776, 707-876, 707-938, 707-945, 707-1055, 707-1071, 707-1072, 707-1073, 707-1075, 707-1078, 707-1080, 707-1095, 707-1100, 707-1102, 707-1104, 707-1108, 707-1109, 707-1112, 707-1115, 707-1117, 707-1119, 707-1133, 707-1135, 707-1144, 707-1145, 707-1150, 707-1162, 707-1163, 707-1164, 707-1166, 707-1167, 707-1168, 707-1169, 707-1170, 707-1171, 707-1176, 710-1147, 714-1041, 715-1086, 716-1337, 717-1106, 719-1106, 720-1107, 722-892, 723-1108, 723-1116, 723-1130, 724-1182, 727-1078, 730-1060, 730-1188, 732-879, 732-982, 732-1090, 732-1167, 732-1190, 737-1019, 738-1186, 739-1305, 740-949, 749-1017, 749-1100, 749-1114, 749-1127, 750-968, 750-1058, 751-937, 751-1336, 754-1133, 755-1127, 755-1336, 757-1255, 763-1048, 763-1059, 764-989, 765-1064, 767-1400, 776-1349, 778-1009, 778-1097, 778-1154, 778-1198, 781-1150, 785-991, 785-1426, 787-1069, 787-1365, 790-1382, 794-1044, 794-1103, 798-1005, 803-1059, 805-1034, 808-1149, 809-1388, 810-1023, 811-1095, 811-1400, 812-1119, 815-1169, 817-1197, 819-1169, 821-1335, 825-1169, 828-1326, 828-1348, 832-1094, 834-1117, 836-1112, 836-1395, 839-1113, 839-1232, 840-1134, 841-1121, 843-1361, 846-1088, 848-1089, 852-1096, 852-1108, 852-1362, 853-1106, 855-1055, 855-1059, 856-1341, 857-1184, 863-1151, 864-1120, 868-1107, 869-1411, 880-1159, 880-1413, 881-1132, 881-1140, 882-1173, 883-1143, 887-1145, 887-1152, 890-1174, 890-1403, 891-1178, 891-1414, 892-1336, 893-1149, 899-1082, 899-1157, 899-1416, 901-1173, 902-1357, 905-1195, 907-1400, 908-1345, 911-1336, 912-1092, 912-1146, 912-1167, 913-1163, 915-1414, 922-1159, 924-1399, 925-1143, 929-1110, 929-1139, 930-1143, 931-1332, 935-1400, 941-1116, 941-1395, 942-1384, 942-1425, 944-1187, 945-1344, 955-1399, 958-1129, 958-1187, 958-1193, 958-1336, 960-1409, 963-1216, 965-1189, 967-1403, 969-1140, 971-1419, 976-1408, 977-1420, 981-1208, 988-1203, 989-1400, 1006-1213, 1008-1400, 1013-1399, 1016-1336, 1022-1407, 1029-1331, 1034-1059, 1035-1336, 1039-1059, 1060-1299, 1132-1410, 1186-1410, 1200-1403
41/3728182CB1/ 1666	1-453, 19-648, 324-968, 386-584, 386-629, 386-889, 474-1155, 535-1153, 635-968, 682-945, 733-1018, 786-1293, 789-1040, 793-1012, 793-1045, 797-1159, 803-1159, 864-1128, 866-1355, 896-1293, 922-1222, 927-1173, 962-1640, 977-1216, 977-1373, 978-1253, 978-1307, 981-1628, 1004-1584, 1015-1305, 1015-1629, 1055-1630, 1102-1619, 1111-1580, 1114-1589, 1126-1643, 1135-1661, 1141-1666, 1165-1441, 1165-1545, 1167-1447, 1185-1638, 1206-1640, 1208-1640, 1211-1664, 1219-1646, 1229-1640, 1230-1664, 1233-1428, 1233-1638, 1233-1661, 1236-1634, 1264-1566, 1264-1640, 1284-1536, 1301-1577, 1307-1634, 1329-1580, 1399-1659, 1420-1664

表 4 - 6

ポリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
42/7500859CB1/ 2096	1-1375, 19-455, 19-486, 20-270, 25-488, 27-194, 27-413, 30-344, 31-488, 32-379, 38-333, 46-350, 51-286, 54-296, 54-349, 56-339, 56-369, 56-376, 57-301, 57-658, 61-347, 62-173, 63-330, 64-356, 67-345, 68-352, 69-348, 75-334, 77-439, 128-488, 153-315, 211-476, 342-488, 487-707, 487-925, 487-1106, 492-741, 492-1031, 492-1045, 492-1066, 498-1179, 512-949, 516-772, 516-1382, 519-1180, 531-915, 534-825, 547-966, 548-864, 552-778, 552-957, 552-1126, 557-795, 559-1135, 572-822, 583-1140, 586-1158, 606-900, 609-1147, 614-899, 617-869, 617-1169, 617-1173, 630-1074, 659-1256, 661-818, 670-928, 680-935, 680-936, 682-883, 682-903, 682-986, 684-1321, 698-995, 713-1101, 713-1103, 724-1359, 729-1358, 730-1325, 739-984, 740-1380, 748-1365, 748-1372, 754-1310, 759-995, 760-1343, 771-1063, 771-1376, 778-1047, 779-1042, 785-1328, 787-1189, 810-1081, 810-1176, 815-1332, 820-1170, 837-1212, 839-1122, 858-1094, 861-1091, 861-1148, 877-1158, 896-1173, 896-1179, 896-1189, 900-1159, 906-1383, 908-1273, 916-1036, 932-1212, 941-1383, 947-1238, 948-1213, 950-1225, 958-1383, 962-1269, 979-1258, 1001-1280, 1017-1274, 1020-1151, 1044-1327, 1045-1152, 1051-1247, 1111-1373, 1112-1376, 1121-1345, 1124-1300, 1126-1349, 1133-1383, 1141-1383, 1142-1383, 1144-1383, 1151-1383, 1152-1383, 1175-1304, 1175-1383, 1220-1383, 1261-1905, 1266-1898, 1487-1916, 1513-1938, 1514-1939, 1515-1936, 1542-1923, 1545-2096, 1613-1888, 1623-1904, 1650-1906, 1667-1910, 1669-1896, 1669-2004, 1673-1949, 1674-1916, 1674-1954, 1683-1979, 1690-1916, 1706-1916, 1708-1966, 1710-1947, 1760-1957, 1792-1978, 1809-1920, 1817-1916, 1817-1917, 1817-1918, 1817-1922, 1817-1923, 1817-1924, 1818-1923, 1826-1916, 1838-1926, 1864-1900
43/7675437CB1/ 1192	1-193, 1-1192, 139-778, 439-1192, 455-780
44/1854688CB1/ 1189	1-590, 1-1189, 391-898, 397-939, 397-1065, 398-759, 398-860, 399-482, 399-653, 400-742, 401-654, 401-975, 401-1111, 401-1164, 403-685, 405-689, 406-674, 406-682, 406-687, 406-1115, 408-644, 408-668, 408-814, 412-654, 412-685, 412-693, 412-944, 413-567, 413-924, 415-603, 417-683, 417-1045, 418-754, 418-1023, 422-646, 422-672, 428-837, 429-1171, 433-988, 438-962, 447-909, 448-738, 456-725, 481-738, 485-737, 486-1005, 586-775, 611-778, 615-812, 647-802, 739-923
45/2118273CB1/ 1200	1-1189, 91-353, 91-409, 91-413, 91-461, 91-574, 91-579, 91-587, 91-588, 97-421, 99-560, 99-691, 100-785, 108-578, 109-574, 109-576, 110-655, 110-656, 111-576, 117-287, 117-340, 117-482, 117-489, 117-577, 117-595, 118-572, 123-535, 130-587, 148-468, 150-527, 172-619, 192-445, 192-569, 202-492, 202-639, 271-911, 292-567, 292-569, 313-514, 326-574, 334-911, 335-628, 340-911, 406-677, 422-557, 439-744, 442-687, 480-1149, 508-1022, 522-949, 569-1113, 571-906, 578-1104, 584-859, 591-854, 591-890, 591-1184, 609-949, 665-1004, 678-880, 678-1188, 684-1175, 688-970, 688-981, 723-1185, 735-1200, 736-1185, 739-1166, 743-1186, 775-1184, 776-1189, 783-1053, 790-1200, 791-1196, 795-1184, 796-

【表 4 - 7】

表 4 - 7

ボリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
---	------

1191, 846-1105, 855-1111, 974-1200, 977-1200

46/7500897CB1/ 1-251, 1-1481, 2-232, 8-250, 10-218, 10-220, 10-293, 11-264, 11-296, 14-234, 29-255, 30-270, 30-287, 32-289, 33-287, 37-310, 37-316, 38-242, 38-339, 39-290, 44-306, 47-310, 48-277, 229-490, 339-601, 339-703, 339-829, 354-829, 359-825, 362-970, 386-927, 388-994, 391-901, 406-1166, 422-703, 424-

1050, 425-953, 439-1210, 447-1156, 454-969, 459-1244, 470-733, 471-1135, 472-767, 480-1065, 484-1048, 493-1163, 502-1012, 520-1029, 524-1166, 544-1385, 578-1150, 587-840, 592-822, 593-846, 593-847, 596-1107, 597-837, 600-856, 605-1171, 605-1201, 618-1442, 633-1234, 646-934, 646-1152, 647-1024, 649-1177, 667-1166, 669-1493, 670-1241, 674-896, 680-1203, 688-1263, 704-1292, 704-1315, 711-1472, 714-1171, 715-1496, 716-1479, 721-1176, 721-1490, 724-862, 724-1404, 727-1392, 728-1476, 733-1412, 746-1000, 749-1383, 760-1495, 764-1276, 788-1497, 795-1498, 801-1500, 802-1457, 804-1295, 808-1474, 818-1468, 828-1467, 876-1362, 887-1435, 912-1513, 915-1474, 920-1291, 929-1497, 931-1496, 938-1185, 938-1487, 941-1199, 950-1501, 971-1476, 981-1256, 982-1497, 988-1492, 989-1125, 989-1242, 989-1474, 997-1509, 1018-1473, 1019-1475, 1020-1482, 1030-1482, 1043-1472, 1058-1496, 1060-1497, 1072-1496, 1092-1346, 1136-1486, 1141-1465, 1185-1456, 1192-1489, 1200-1473, 1213-1474, 1222-1466, 1222-1482, 1223-1485, 1234-1485, 1241-1485, 1247-1494

47/7502575CB1/ 1-571, 207-623, 219-607, 219-608, 220-622, 220-623, 230-538, 233-838, 245-891, 248-688, 266-623, 266-870, 267-1143, 269-937, 287-619, 290-731, 306-619, 358-622, 402-920, 406-746, 406-748, 406-749, 406-752, 423-752, 423-1053, 468-1012, 595-1207, 612-1060, 683-1238, 830-1267, 848-1273, 850-1289, 874-1444, 925-1442, 939-1278, 949-1426, 952-1397, 953-1441, 954-1286, 954-1380, 956-1364, 958-1427, 960-1208, 960-1441, 960-1463, 972-1409, 973-1321, 976-1299, 983-1255, 988-1532, 1090-1701, 1094-1318, 1102-1561, 1143-1764, 1167-1416, 1167-1639, 1170-1563, 1244-1758, 1247-1828, 1252-1761, 1269-1788, 1303-1763, 1306-1884, 1313-1789, 1315-1954, 1345-1804, 1358-2081, 1362-1482, 1380-1640, 1387-1863, 1397-1898, 1399-1685, 1400-1770, 1403-1655, 1418-1678, 1426-2066, 1427-1792, 1439-1482, 1459-1975, 1471-1742, 1476-2023, 1478-1745, 1494-1765, 1496-2046, 1496-2134, 1496-2140, 1498-1776, 1506-1967, 1507-1796, 1512-1810, 1529-1816, 1530-1778, 1530-1788, 1532-1960, 1532-2038, 1532-2047, 1538-1781, 1540-2160, 1557-1811, 1557-2041, 1558-2036, 1561-2245, 1563-1812, 1563-1823, 1568-2219, 1576-1864, 1590-2310, 1609-2099, 1610-1912, 1611-1848, 1622-2391, 1654-2179, 1665-1921, 1665-2391, 1666-2422, 1683-2174, 1760-2411, 1763-2213, 1767-2313, 1802-2363, 1802-2539, 1802-2551, 1821-2559, 1830-2407, 1832-2092, 1861-2140, 1861-2565, 1862-2399, 1863-2115, 1863-2427, 1869-2304, 1893-2355, 1894-2191, 1895-2331, 1900-2127, 1905-2341.

10
20
30

【表 4 - 8】

表 4 - 8

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列長	配列断片
	1909-2160, 1924-2200, 1941-2529, 1954-2208, 1956-2485, 1957-2377, 1957-2380, 1963-2600, 1963-2624, 1995-2666, 1999-2474, 2018-2620, 2020-2448, 2027-2306, 2028-2266, 2034-2577, 2044-2603, 2049-2235, 2051-2314, 2051-2612, 2052-2639, 2058-2580, 2066-2317, 2069-2333, 2069-2600, 2081-2594, 2083-2527, 2093-2334, 2093-2364, 2101-2327, 2103-2600, 2107-2337, 2114-2398, 2119-2635, 2139-2411, 2144-2612, 2146-2609, 2150-2612, 2156-2612, 2157-2638, 2163-2608, 2165-2613, 2168-2663, 2169-2612, 2170-2608, 2173-2609, 2173-2615, 2174-2432, 2177-2617, 2181-2612, 2182-2438, 2184-2633, 2186-2626, 2188-2627, 2190-2608, 2190-2610, 2196-2610, 2203-2612, 2204-2631, 2210-2631, 2218-2531, 2230-2471, 2230-2595, 2230-2613, 2230-2634, 2239-2632, 2246-2612, 2247-2511, 2250-2605, 2253-2609, 2254-2605, 2256-2616, 2260-2615, 2263-2630, 2267-2610, 2267-2612, 2277-2542, 2277-2571, 2277-2581, 2277-2609, 2277-2615, 2277-2618, 2277-2622, 2279-2570, 2283-2523, 2284-2612, 2291-2616, 2294-2605, 2297-2615, 2302-2608, 2303-2608, 2304-2615, 2306-2546, 2306-2561, 2306-2601, 2306-2627, 2307-2582, 2307-2612, 2310-2608, 2311-2608, 2316-2544, 2316-2608, 2341-2571, 2341-2612
48/7500178CB1/ 2320	1-731, 9-143, 11-855, 15-420, 22-403, 22-622, 22-674, 22-885, 25-113, 30-176, 30-526, 30-693, 31-649, 33-308, 34-276, 36-319, 37-701, 38-296, 39-132, 39-544, 41-676, 43-771, 46-158, 50-745, 51-1050, 56-674, 58-614, 59-466, 62-551, 62-736, 67-640, 68-572, 76-769, 76-770, 76-774, 76-809, 76-855, 76-856, 76-894, 76-1011, 76-1016, 77-952, 81-772, 111-853, 132-621, 137-335, 137-338, 140-392, 153-371, 158-660, 159-406, 176-697, 208-671, 213-729, 219-621, 229-690, 241-690, 256-878, 258-1058, 264-549, 321-585, 353-748, 382-672, 391-688, 411-650, 411-711, 411-995, 434-708, 445-704, 455-699, 459-1063, 469-713, 490-963, 522-1492, 526-1194, 532-672, 533-798, 570-678, 570-829, 570-844, 570-1044, 579-821, 579-861, 596-802, 602-863, 610-745, 614-845, 614-936, 620-832, 620-924, 681-940, 692-935, 692-955, 692-1269, 693-874, 698-957, 698-1022, 698-1181, 698-1284, 699-923, 715-1492, 722-1102, 723-977, 737-1196, 740-1249, 742-992, 748-1492, 774-1024, 818-1492, 821-1414, 821-1509, 821-1578, 883-1169, 1048-1302, 1067-1507, 1067-1647, 1069-1268, 1069-1352, 1069-1364, 1070-1366, 1072-1641, 1083-1520, 1089-1222, 1089-1320, 1089-1624, 1096-1349, 1097-1390, 1124-1659, 1134-1389, 1139-1607, 1143-1332, 1146-1506, 1146-1808, 1158-1684, 1161-1466, 1166-1426, 1184-1345, 1190-1450, 1194-1681, 1221-1502, 1221-1511, 1222-1502, 1230-1387, 1243-1528, 1246-1661, 1253-1550, 1261-1883, 1262-1515, 1277-1660, 1283-1676, 1284-1513, 1284-1541, 1284-1604, 1298-1578, 1299-1548, 1301-1816, 1306-1548, 1306-1996, 1307-1543, 1308-1941, 1312-1762, 1320-1576, 1340-1609, 1340-1630, 1357-1769, 1369-1801, 1385-1656, 1385-1669, 1385-1941, 1386-2256, 1388-1901, 1391-1661, 1392-1914, 1404-1661, 1409-2252, 1412-1675, 1416-1691, 1421-1610, 1426-2266, 1431-2012, 1434-1885, 1434-2036, 1462-2298, 1478-1606, 1498-1660, 1503-1786, 1509-2287, 1523-1780, 1525-1783, 1529-2251, 1549-1804, 1553-1928, 1553-2265, 1555-1901, 1564-1851, 1565-1777, 1572-1810, 1572-

【 0 3 9 9 】

10

20

30

【表 4 - 9】

表 4 - 9

ポリスクレオチ ド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
	1818, 1572-1867, 1573-1846, 1574-1822, 1592-2057, 1592-2175, 1592-2287, 1593-1827, 1593-2260, 1593-2269, 1602-1791, 1602-1845, 1604-1857, 1614-2212, 1619-1920, 1623-1873, 1626-1788, 1627-2260, 1634-2301, 1646-2128, 1651-2320, 1652-1944, 1654-2184, 1658-1855, 1662-1975, 1667-2044, 1670-2235, 1673-1924, 1679-2298, 1683-1979, 1688-1847, 1690-2320, 1692-2245, 1693-2305, 1697-1951, 1698-2274, 1701-2320, 1706-1914, 1723-1960, 1728-2230, 1729-2313, 1731-1973, 1739-2320, 1743-2320, 1747-2008, 1755-2006, 1756-1975, 1756-2023, 1757-1865, 1768-2294, 1785-2064, 1798-1955, 1798-2060, 1801-2320, 1804-2044, 1804-2102, 1804-2320, 1810-2311, 1814-2318, 1816-2104, 1819-2320, 1822-2138, 1824-2304, 1824-2320, 1834-2304, 1835-2320, 1842-2122, 1842-2320, 1848-2308, 1849-2304, 1853-2136, 1854-2100, 1854-2134, 1856-2076, 1856-2088, 1856-2320, 1857-2319, 1859-2123, 1859-2318, 1860-2315, 1860-2317, 1861-2128, 1861-2300, 1862-2302, 1866-2125, 1866-2309, 1867-2300, 1868-2311, 1871-2320, 1874-2307, 1875-2302, 1882-2304, 1882-2305, 1885-2305, 1889-2296, 1889-2306, 1890-2304, 1891-2307, 1893-2165, 1896-2308, 1897-2304, 1900-2294, 1914-2304, 1918-2320, 1920-2298, 1923-2298, 1925-2222, 1934-2303, 1935-2263, 1936-2308, 1937-2304, 1937-2309, 1950-2307, 1963-2216, 1967-2272, 1978-2304, 1981-2305, 1986-2298, 1992-2246, 2011-2304, 2043-2215, 2049-2298, 2076-2320, 2082-2309, 2082-2312, 2089-2313, 2089-2314, 2090-2304, 2122-2273, 2142-2263, 2155-2269, 2165-2277, 2166-2305, 2167-2320, 2176-2302, 2229-2304
49/4303692CBI/ 942	1-548, 1-606, 264-868, 278-530, 278-870, 345-858, 482-935, 524-935, 759-935, 832-942
50/7500228CBI/ 1735	1-620, 2-1706, 14-815, 19-713, 23-546, 33-317, 33-332, 33-607, 33-633, 34-283, 34-579, 81-819, 81-828, 81-833, 81-862, 81-869, 81-994, 88-889, 157-1092, 168-714, 203-901, 223-1092, 261-1092, 263-731, 274-1092, 356-472, 415-1092, 432-694, 469-880, 469-905, 496-956, 986-1219, 986-1222, 986-1241, 986-1286, 986-1677, 1001-1672, 1003-1142, 1023-1301, 1023-1341, 1031-1632, 1038-1321, 1038-1670, 1044-1662, 1055-1706, 1058-1314, 1064-1641, 1068-1508, 1072-1671, 1081-1330, 1101-1351, 1116-1533, 1116-1555, 1132-1636, 1137-1669, 1139-1513, 1143-1690, 1146-1587, 1154-1331, 1160-1582, 1184-1390, 1187-1564, 1190-1487, 1193-1730, 1195-1684, 1202-1645, 1213-1490, 1217-1707, 1220-1684, 1222-1695, 1228-1524, 1228-1685, 1230-1685, 1232-1683, 1236-1489, 1238-1685, 1244-1513, 1245-1667, 1251-1544, 1253-1684, 1253-1706, 1256-1684, 1257-1684, 1260-1686, 1263-1528, 1263-1706, 1263-1712, 1264-1686, 1267-1687, 1268-1687, 1269-1687, 1270-1524, 1273-1712, 1274-1551, 1275-1684, 1277-1685, 1286-1691, 1288-1688, 1288-1689, 1289-1725, 1290-1581, 1290-1735, 1291-1644, 1291-1706, 1303-1696, 1305-1709, 1306-1706, 1312-1500, 1314-1596, 1320-1684, 1323-1609, 1334-1623, 1334-1629, 1343-1515, 1348-1706, 1352-1711, 1358-1698, 1363-1668, 1365-1686, 1401-1735, 1402-1685, 1410-1730, 1411-1706, 1413-1695, 1413-1707, 1420-1706, 1423-1685, 1463-

【 0 4 0 0 】

10
20
30

【表 4 - 1 0】

表 4 - 1 0

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配列長	配列断片
---	------

1735, 1485-1684, 1496-1564, 1507-1694, 1507-1696, 1520-1735, 1556-1681, 1558-1705, 1577-1666,
1584-1707, 1584-1709, 1593-1735, 1602-1685, 1608-1684, 1615-1691

517500492CB1/
1484 1-260, 50-260, 75-246, 85-260, 233-721, 233-723, 233-724, 262-1069, 277-1407, 296-811, 399-1092,
417-551, 439-602, 458-801, 537-846, 537-1003, 537-1014, 537-1034, 537-1105, 537-1106, 541-1084,
581-1081, 598-927, 616-927, 655-1106, 666-929, 709-962, 727-1105, 732-1105, 736-1103, 746-1075,
747-1099, 763-1099, 790-1099, 791-1008, 791-1104, 929-1106, 1033-1293, 1033-1329, 1036-1105,
1041-1331, 1041-1354, 1043-1331, 1044-1260, 1044-1484, 1048-1293, 1103-1397, 1170-1404, 1213-
1309

527500910CB1/
973 1-249, 2-947, 5-301, 9-278, 34-205, 298-867, 305-384, 305-498, 305-761, 305-837, 305-869, 305-921,
308-848, 308-869, 309-876, 310-859, 311-623, 314-615, 315-778, 321-855, 359-869, 360-657, 361-636,
362-638, 365-619, 366-928, 369-810, 371-915, 372-757, 375-941, 378-660, 378-674, 384-651, 389-652,
391-666, 391-713, 397-596, 399-649, 401-913, 403-709, 404-664, 408-665, 409-864, 412-654, 412-694,
412-817, 415-709, 416-909, 421-666, 421-913, 422-909, 424-799, 429-674, 433-799, 436-657, 436-832,
436-949, 446-732, 446-858, 446-915, 452-648, 454-907, 454-909, 458-915, 460-934, 463-726, 463-909,
463-930, 463-931, 466-898, 466-926, 466-929, 467-942, 468-915, 469-728, 469-915, 471-680, 473-774,
474-756, 475-808, 481-730, 481-811, 481-826, 482-681, 482-908, 483-731, 485-930, 489-613, 492-944,
494-895, 494-947, 495-912, 498-701, 503-743, 505-713, 505-909, 506-929, 508-943, 509-923, 509-973,
510-924, 514-749, 515-730, 518-722, 518-759, 518-909, 518-930, 520-726, 522-932, 527-906, 533-790,
533-912, 535-908, 535-932, 536-921, 537-788, 537-909, 538-739, 538-783, 541-754, 541-770, 541-909,
543-671, 543-926, 544-970, 548-745, 548-928, 552-788, 554-931, 556-805, 560-827, 564-818, 568-912,
572-789, 574-770, 578-912, 579-845, 579-926, 585-786, 585-824, 595-860, 601-801, 606-840, 612-866,
612-874, 632-778, 652-873, 688-796

10

20

30

【表 4 - 1 1】

表 4 - 1 1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
53/7188209CB1/ 1469	1-614, 1-1469, 21-751, 22-813, 113-788, 189-462, 189-795, 203-819, 350-858, 353-856, 619-871, 626-762, 626-1230, 811-1469
54/7502299CB1/ 1720	1-709, 3-751, 85-712, 86-849, 134-1076, 160-843, 187-743, 189-728, 227-773, 244-878, 261-1038, 265-846, 272-924, 278-814, 310-767, 356-805, 356-945, 378-943, 399-847, 407-927, 419-1186, 426-751, 428-877, 438-850, 452-1017, 461-961, 474-1112, 482-752, 485-764, 492-1086, 498-1345, 500-806, 500-1009, 509-930, 518-769, 530-1028, 558-818, 561-843, 588-1178, 588-1223, 601-1189, 606-1141, 616-1057, 619-898, 656-1085, 665-938, 667-1458, 674-929, 719-982, 723-1352, 729-1226, 732-1268, 741-1255, 742-1389, 756-1100, 757-1434, 770-1216, 781-1204, 781-1287, 785-1088, 813-1091, 813-1093, 829-1151, 847-1620, 854-1553, 869-1374, 880-1136, 880-1151, 883-1165, 883-1462, 902-1186, 907-1658, 910-1658, 927-1651, 931-1671, 933-1194, 942-1715, 949-1253, 951-1513, 952-1364, 956-1229, 958-1655, 960-1301, 965-1700, 975-1652, 984-1620, 989-1266, 990-1495, 1002-1294, 1008-1329, 1009-1620, 1017-1705, 1018-1705, 1021-1620, 1022-1617, 1026-1287, 1037-1552, 1039-1338, 1043-1335, 1050-1576, 1054-1567, 1056-1561, 1058-1517, 1062-1694, 1063-1533, 1065-1322, 1086-1646, 1087-1683, 1087-1706, 1096-1557, 1101-1362, 1103-1556, 1110-1692, 1114-1698, 1117-1369, 1117-1394, 1119-1372, 1120-1638, 1126-1639, 1127-1424, 1133-1705, 1136-1580, 1142-1700, 1144-1564, 1145-1535, 1146-1680, 1152-1701, 1160-1494, 1168-1657, 1180-1466, 1182-1648, 1184-1686, 1187-1692, 1197-1718, 1199-1700, 1222-1718, 1234-1704, 1241-1712, 1247-1700, 1247-1704, 1253-1535, 1256-1714, 1262-1707, 1268-1697, 1271-1700, 1279-1720, 1281-1542, 1285-1702, 1288-1701, 1290-1704, 1298-1698, 1300-1701, 1313-1704, 1322-1582, 1327-1700, 1327-1705, 1328-1687, 1328-1707, 1331-1700, 1333-1703, 1341-1719, 1382-1668, 1383-1703, 1388-1701, 1389-1711, 1394-1704, 1400-1690, 1404-1661, 1404-1701, 1406-1668, 1413-1700, 1436-1719

【表 4 - 1 2】

表 4 - 1 2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
55/7503072CB1/ 2062	1-578, 31-717, 49-941, 76-669, 76-695, 145-801, 181-937, 251-853, 331-989, 387-1211, 407-1115, 452-1123, 455-1157, 552-1138, 566-1214, 567-1227, 598-1286, 604-1165, 610-1159, 618-1158, 631-1412, 639-1127, 654-1349, 662-1290, 665-1156, 709-1249, 710-1453, 714-1404, 729-1326, 749-1240, 765-1540, 766-1538, 767-1440, 770-1483, 790-1452, 798-1569, 804-1453, 805-1403, 815-1283, 815-1440, 816-1427, 825-1313, 825-1325, 825-1327, 825-1335, 826-1504, 830-1433, 846-1349, 860-1461, 863-1404, 863-1490, 873-1361, 898-1498, 902-1417, 905-1451, 905-1563, 907-1519, 907-1576, 908-1582, 909-1440, 912-1601, 934-1547, 934-1568, 950-1602, 955-1462, 958-1463, 965-1656, 983-1547, 992-1572, 998-1759, 999-1724, 1030-1090, 1038-1612, 1061-1709, 1076-1580, 1085-1107, 1089-1684, 1100-1613, 1104-1603, 1108-1830, 1109-1668, 1110-1748, 1117-1560, 1124-1772, 1129-1641, 1131-1790, 1139-1902, 1141-1632, 1142-1761, 1149-1718, 1154-1656, 1156-1848, 1159-1904, 1170-1761, 1171-1656, 1178-1920, 1191-1631, 1191-1707, 1199-1786, 1220-1975, 1230-1780, 1235-2022, 1242-1742, 1264-2023, 1266-1814, 1288-1859, 1294-1901, 1294-1957, 1297-1874, 1306-1940, 1310-1873, 1319-1920, 1320-1843, 1338-1795, 1349-1795, 1352-1793, 1352-1812, 1352-1906, 1352-1939, 1356-1795, 1363-2046, 1365-2013, 1371-1777, 1391-1997, 1411-2060, 1427-2006, 1440-2012, 1442-1871, 1468-1988, 1468-2025, 1477-2058, 1545-2013, 1550-2051, 1554-2054, 1554-2058, 1561-2024, 1566-2024, 1570-2062, 1588-2024, 1909-1995
56/6978750CB1/ 1544	1-233, 149-754, 155-407, 316-859, 316-918, 471-1125, 682-1265, 682-1366, 1030-1544
57/7499506CB1/ 2800	1-837, 47-722, 99-737, 119-710, 148-724, 155-941, 196-622, 197-614, 202-601, 271-2800, 395-652, 492-860, 514-960, 524-960, 670-960, 1156-1538, 1163-1538, 1249-1588, 1254-1373, 1254-1378, 1256-1361, 1529-1717, 1614-2059, 1653-1920, 1682-2207, 1712-2154, 1749-1985, 1796-2072, 1845-2256, 1879-2223, 1921-2190, 2060-2163, 2060-2204, 2184-2577, 2184-2609, 2200-2609, 2202-2574, 2236-2609

10

20

30

40

【 0 4 0 3】

【表 4 - 1 3】

表 4 - 1 3

ポリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
58/7503595CB1/ 3845	1-194, 13-309, 13-446, 27-792, 28-468, 28-563, 29-317, 36-194, 39-570, 39-598, 47-638, 58-508, 58-3845, 70-598, 70-609, 73-417, 75-570, 86-593, 108-953, 141-377, 167-745, 182-395, 204-581, 215-679, 223-953, 245-484, 247-720, 267-527, 267-953, 279-570, 291-552, 333-731, 338-560, 338-707, 352-623, 374-1154, 380-529, 381-835, 384-874, 387-660, 400-953, 407-655, 411-839, 413-809, 420-708, 427-953, 429-925, 432-534, 432-1007, 433-712, 439-996, 457-991, 459-947, 461-1046, 503-693, 547-752, 550-1105, 560-805, 561-809, 569-976, 581-809, 588-883, 588-888, 589-829, 626-1122, 633-827, 650-1021, 650-1205, 651-943, 699-1185, 704-838, 704-1352, 750-1291, 769-953, 785-1049, 795-1201, 809-1040, 809-1044, 809-1439, 815-1281, 815-1396, 819-1253, 852-1036, 853-1036, 884-1378, 887-1555, 901-1486, 905-1151, 910-1137, 915-1148, 922-1154, 929-1435, 941-1458, 952-1205, 963-1223, 993-1499, 994-1526, 999-1615, 1010-1304, 1045-1657, 1045-1702, 1053-1577, 1059-1593, 1079-1649, 1080-1423, 1084-1791, 1084-1911, 1111-1427, 1118-1748, 1141-1402, 1159-1426, 1169-1796, 1175-1552, 1214-1467, 1224-1541, 1247-1518, 1259-1511, 1275-2079, 1308-1736, 1355-1545, 1359-1932, 1368-1925, 1380-1869, 1387-1650, 1387-1696, 1393-2007, 1394-1625, 1401-1925, 1405-1819, 1409-1819, 1412-1925, 1418-1805, 1423-1925, 1426-1623, 1485-1925, 1486-2079, 1550-1831, 1560-1850, 1636-2087, 1665-1865, 1677-1925, 1817-1925, 1817-2432, 1818-2181, 1848-2110, 1848-2298, 1848-2329, 1848-2482, 1848-2492, 1894-2423, 1915-2631, 1971-2249, 1979-2610, 1983-2243, 1987-2238, 1987-2497, 1996-2448, 2012-2665, 2023-2303, 2078-2273, 2091-2399, 2098-2248, 2098-2690, 2104-2642, 2124-2721, 2139-2631, 2154-2571, 2194-2591, 2212-2454, 2248-2471, 2248-2690, 2258-2537, 2258-2541, 2301-2539, 2302-2567, 2302-2605, 2319-2626, 2327-2589, 2334-2951, 2334-2989, 2337-2435, 2341-2609, 2374-2583, 2387-2528, 2457-2613, 2840-3402, 2840-3449, 2840-3461, 2840-3493, 2840-3495, 2840-3510, 2840-3629, 2891-3146, 2911-3454, 2913-3203, 2925-3611, 2935-3446, 2945-3508, 2956-3260, 2959-3641, 3049-3350, 3053-3773, 3126-3642, 3152-3771, 3173-3841, 3199-3418, 3199-3419, 3219-3744, 3251-3498, 3470-3713
59/7504539CB1/ 2035	1-568, 1-612, 1-618, 1-644, 1-645, 1-662, 1-681, 1-681, 1-695, 1-701, 1-757, 1-812, 25-493, 32-690, 33-676, 37-660, 46-718, 68-784, 108-863, 115-863, 128-750, 151-924, 160-873, 162-722, 267-848, 399-1121, 594-1219, 608-1294, 792-1538, 951-1565, 979-1572, 1007-1759, 1091-2035, 1109-1678, 1114-1879, 1131-1839, 1227-1902, 1231-1828, 1262-1799

【表 4 - 1 4】

表 4 - 1 4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
60/1740257CBI/ 1901	1-618, 1-646, 71-696, 159-1168, 309-799, 326-875, 376-565, 404-884, 416-985, 430-640, 434-794, 449-1028, 452-722, 466-1021, 478-885, 517-1126, 520-1058, 527-648, 527-766, 527-809, 547-663, 569-1014, 601-1171, 611-893, 612-1123, 613-1118, 616-836, 616-1138, 618-889, 640-1070, 644-915, 645-902, 646-902, 653-1229, 657-1181, 659-895, 675-898, 726-1086, 753-1023, 778-900, 778-1129, 798-1008, 799-1188, 805-1052, 836-1127, 852-1133, 862-1116, 893-1128, 895-1099, 926-1126, 926-1128, 926-1524, 971-1213, 977-1226, 1035-1588, 1039-1329, 1048-1270, 1097-1379, 1101-1188, 1137-1649, 1167-1640, 1169-1360, 1169-1364, 1169-1487, 1169-1636, 1170-1317, 1170-1360, 1172-1721, 1172-1777, 1178-1708, 1183-1655, 1187-1438, 1187-1544, 1188-1530, 1188-1627, 1188-1635, 1188-1666, 1189-1528, 1189-1586, 1189-1592, 1189-1616, 1189-1648, 1189-1652, 1189-1659, 1190-1551, 1190-1577, 1190-1627, 1190-1636, 1190-1648, 1199-1360, 1205-1669, 1208-1655, 1217-1713, 1220-1261, 1221-1551, 1221-1788, 1227-1680, 1236-1517, 1238-1480, 1238-1617, 1238-1732, 1238-1837, 1239-1761, 1243-1497, 1243-1512, 1244-1584, 1249-1520, 1251-1510, 1251-1865, 1255-1513, 1256-1716, 1257-1482, 1257-1549, 1259-1496, 1259-1510, 1259-1523, 1259-1735, 1260-1567, 1260-1867, 1264-1487, 1266-1532, 1266-1794, 1266-1845, 1282-1718, 1287-1485, 1291-1525, 1291-1559, 1307-1680, 1315-1572, 1324-1893, 1325-1582, 1329-1636, 1335-1584, 1336-1539, 1337-1822, 1347-1619, 1347-1894, 1349-1900, 1353-1603, 1354-1580, 1356-1606, 1361-1605, 1371-1665, 1372-1622, 1372-1659, 1385-1652, 1399-1670, 1437-1603, 1437-1633, 1437-1901, 1438-1720, 1442-1900, 1469-1760, 1473-1879, 1478-1805, 1482-1876, 1496-1713, 1496-1869, 1496-1881, 1507-1867, 1524-1741, 1524-1763, 1524-1776, 1530-1850, 1535-1779, 1599-1901, 1605-1901, 1610-1839, 1610-1859, 1633-1895, 1634-1857, 1636-1857, 1636-1879, 1641-1900, 1645-1901, 1664-1870, 1664-1881, 1666-1899, 1702-1901, 1703-1871, 1704-1871, 1715-1878, 1752-1879, 1754-1901, 1760-1901, 1777-1901, 1800-1885, 1804-1901, 1820-1901, 1823-1881
61/7233657CBI/ 1403	1-358, 107-358, 154-681, 357-1005, 591-879, 654-1106, 746-912, 794-1024, 827-956, 827-1084, 827-1382, 827-1403, 855-1107, 899-1107, 925-1175

10

20

30

40

【表 4 - 1 5】

表 4 - 1 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ID/配 列長	配列断片
62/7503434CB1/ 1903	1-239, 1-482, 1-529, 1-552, 1-624, 1-1896, 1-1903, 3-281, 4-619, 13-276, 19-287, 19-505, 21-173, 27-575, 36-568, 38-306, 38-845, 45-427, 45-479, 45-559, 45-619, 45-622, 54-509, 54-578, 94-577, 95-530, 119-624, 136-550, 144-413, 144-578, 206-562, 209-585, 217-581, 228-541, 253-405, 274-465, 280-432, 308-434, 312-622, 317-551, 320-533, 328-606, 638-1031, 657-1300, 668-952, 680-1329, 728-940, 739-1006, 743-1591, 768-1589, 791-1589, 798-1079, 833-1354, 846-1101, 849-1493, 910-1588, 917-1405, 931-1402, 941-1255, 954-1186, 986-1225, 1005-1289, 1007-1589, 1011-1519, 1011-1529, 1019-1464, 1020-1489, 1026-1514, 1027-1387, 1027-1518, 1027-1519, 1027-1529, 1028-1511, 1037-1517, 1052-1699, 1066-1257, 1066-1481, 1070-1518, 1088-1723, 1094-1392, 1112-1732, 1123-1519, 1123-1578, 1123-1641, 1123-1652, 1128-1376, 1136-1402, 1160-1287, 1173-1691, 1199-1328, 1217-1497, 1217-1763, 1218-1661, 1226-1826, 1233-1887, 1235-1742, 1263-1737, 1286-1419, 1286-1770, 1288-1459, 1303-1564, 1303-1600, 1320-1752, 1337-1736, 1341-1728, 1364-1652, 1402-1672, 1421-1741, 1443-1894, 1454-1847, 1457-1895, 1493-1780, 1503-1752, 1507-1838, 1554-1771, 1623-1846, 1730-1892
63/278182CB1/ 739	1-328, 1-447, 1-599, 1-722, 1-729, 10-482, 136-719, 245-739, 250-739, 269-730, 274-730, 279-733, 280-731, 283-734, 288-730, 292-728, 304-739, 308-739, 310-730, 310-733, 314-730, 320-730, 326-739, 327-730, 333-733, 333-736, 341-730, 346-604, 346-721, 346-739, 347-730, 349-730, 358-728, 359-734, 364-654, 365-518, 365-575, 365-634, 367-680, 386-739, 408-447, 426-739, 446-690, 446-730, 446-731, 465-728, 528-616, 528-735, 528-739, 531-739, 543-733, 545-731, 548-730
64/7505738CB1/ 2853	1-478, 1-575, 9-622, 9-768, 18-2853, 1046-1632, 1146-1793, 1163-1785, 1172-1736, 1172-1750, 1172-1760, 1172-1768, 1172-1774, 1172-1776, 1172-1780, 1172-1785, 1172-1791, 1172-1805, 1172-1812, 1172-1813, 1172-1814, 1172-1818, 1172-1821, 1172-1832, 1172-1835, 1172-1837, 1172-1838, 1172-1841, 1172-1843, 1172-1853, 1172-1865, 1172-1866, 1172-1878, 1172-1940, 1172-1956, 1174-1846, 1175-1808, 1175-1858, 1175-1956, 1175-2059, 1179-1810, 1181-1966, 1194-1955, 1197-1852, 1207-1866, 1233-1867, 1259-1905, 1269-1782, 1276-1867, 1294-1977, 1302-1810, 1334-1768, 1347-1837, 1426-1855, 1466-1995

【表 5 - 1】

表 5 - 1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト ID:	代表的ライブラリ
33	1915726CB1	BRSTNOT03
34	3822072CB1	BONSTUT01
35	7340485CB1	SINTNON02
36	7500806CB1	STOMFET01
37	7500807CB1	STOMFET01
38	7975166CB1	STOMTDC01
39	2013270CB1	TESTNOT03
40	222833CB1	SINTFER02
41	3728182CB1	SMCCNON03
42	7500859CB1	ADRETUE02
43	7675437CB1	BMARNOT02
44	1854688CB1	BEPINON01
45	2118273CB1	PENITUT01
46	7500897CB1	BLADTUT06
47	7502575CB1	FIBRTXS07
48	7500178CB1	BRAITUT02
49	4303692CB1	BRSTTUT18
50	7500228CB1	SCORNON02
51	7500492CB1	MENTNOT01
52	7500910CB1	TLYMNOT08
53	7188209CB1	BRSTTUT18
54	7502299CB1	HEARNON09
55	7503072CB1	NERDTDN03
56	6978750CB1	BRAUTDR04
57	7499506CB1	PANCNOE02
58	7503595CB1	BRABDIR01
59	7504539CB1	HEAONOC01
60	1740257CB1	HIPONON01
61	7233657CB1	LATRUT02

10

20

30

40

【表 5 - 2】

表 5 - 2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジエクト ID:	代表的ライブラリ
62	7503434CB1	LATRTUT02
63	278182CB1	TESTNOT03
64	7505738CB1	LIVRTUE01

10

20

30

40

表 6 - 1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明	
ADRETUE02	PCDNA2.1	この5'に偏向してランダムプライムされたライブラリは、49才白人男性の…側副腎摘出時に除去された右副腎腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理は、副腎皮質細胞癌を示し、これは、ほぼ標本全体を構成した。腫瘍は副腎へ接着していた。副腎は軽度の皮質萎縮を示した。腫瘍は被包性で、周囲に薄い(1~3mm)結合組織の縁があった。患者は副腎癌、腹痛、発熱(不明な起源による)、および欠乏性貧血を示した。患者の病歴には良性高血圧がある。以前の手術としてはアデノイド口蓋扁桃摘出術があった。患者の服用薬剤には、アスピリン、カルシウム、および鉄を含む。家族歴は、母親にアテローム性冠動脈疾患、父親に脳血管発作およびアテローム性冠動脈疾患、祖父母に良性高血圧がある。	
BEPINON01	PSPORT	ノーマライズしたライブラリは、気管支上皮ライブラリからの512万個の独立クローンによって作製した。RNAは54歳の白人男性に由来の気管支上皮初代細胞株から作製した。ノーマライズとハイブリダイズの条件は、Soares 他、PNAS (1994) 91:9228 から適応し、長い(24時間)リアニールハイブリダイズ期間を用いた。	
BLADTUT06	pINCY	ライブラリは、根治的前立腺除去、及び胃瘻造設術時の58才白人男性から取り除かれた膀胱腫瘍組織から単離されたRNAを用いて作製された。病理は左膀胱壁にグレード3の移行性細胞癌が見られた。残りの膀胱には顕著な膀胱炎があり、生体内原位置に散在する微小病巣の移行性細胞癌を伴っていた。患者の病歴には狭心症、肺気腫および喫煙がある。家族歴には急性心筋梗塞、アテローム硬化型冠動脈疾患およびII型糖尿病がある。	
BMARNOT02	PBLUESCRIP T	ライブラリは24人の男女白人の供与者(16才~70才)の骨髄から単離されたRNAを用いて作成された。(RNAはClontechから得た)	
BONSTUT01	pINCY	ライブラリは18歳白人女性の軟部組織の切除を伴う診査開腹時に摘出された仙骨腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理検査では、仙骨の巨大細胞腫瘍が示された。患者の病歴には、軟部組織の悪性腫瘍が含まれていた。家族歴には前立腺癌が含まれていた。	

表 6 - 2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明	
BRABDIR01	pINCY	ライブラリは脳血管事故死亡の 57 才の白人男性の脳から除去した罹病小脳組織から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴には、ハンチントン病、肺気腫およびニコチン中毒が見られた。	
BRAITUT02	PSPORT1	ライブラリは、58 才の白人男性の脳髄膜病変の切除時に前頭葉から採取した脳腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学検査では、グレード 2 の転移性副腎腫が見られた。患者の病歴は、グレード 2 の腎細胞癌、不眠症および慢性的の気道閉塞などであった。家族歴には腎臓の悪性腫瘍が含まれている。	
BRAUTDR04	PCDNA2.1	このランダムプライムされたライブラリは、胆管癌で死亡した 55 才の白人女性から除去されプールされた、線状体、背側尾状核、背側殻および腹側側坐核組織から単離された RNA を用いて作製された。病理は、円蓋部全体に優勢な軽度の髄膜線維形成があり、帯状皮質白質および視床に軸索球状体が散在し、嗅内皮質および中脳水道灰白質領域に、少数の散在性神経原繊維変化を示した。随伴する腫瘍組織の病理は、残存腫瘍または再発性腫瘍を持つ高分化型の肝臓胆管癌を示した。患者の病歴には、胆管癌、術後バッド・キアーリ症候群、胆汁性腹水、水胸症、脱水症、栄養不良、乏尿、および急性腎不全がある。過去の手術には、胆嚢切除術および、肝臓の 85% の摘除がある。	
BRSTNOT03	PSPORT1	ライブラリは、54 才の白人女性の両側性根治的乳房切除時に採取した罹病乳房組織から単離した RNA を用いて作製した。随伴する腫瘍組織の病理は、残存する浸潤性でグレード 3 の乳管腺癌を示した。患者の病歴には、腎感染および尖圭コンジロームがある。家族歴には、良性高血圧、高脂血症、および大腸の悪性新生物がある。	10
BRSTTUT18	pINCY	ライブラリは 68 才の女性の非定型的右乳房切除時に採取した右乳房腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は乳房の腺管癌（浸潤性、高グレード）を示した。乳房実質は大量の厚い線維性乳房組織によって囲まれた堅い腫瘍塊を示した。	20
			30
			40

表 6 - 3

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
FIBRTXS07	pINCY	このサブトラクションされたライブラリは、皮膚フィブロプラスタのライブラリの130万のクローンを用いて作製され、未処置の皮膚フィブロプラスタ組織のライブラリの280万のクローンとの2回のサブトラクションハイブリダイゼーションにかけられた。サブトラクション開始ライブラリは、31才の白人女性の乳房から切除した、処理済み皮膚フィブロプラスタ組織から単離したRNAを用いて作製した。この細胞は9CIS レチノイン酸で処理した。サブトラクションハイブリダイゼーションプロブは同じドナーからの未処理の皮膚フィブロプラスタ組織から単離されたRNAから同様に作製されたライブラリから得られた。サブトラクションハイブリダイゼーションの諸条件は、Swaroop 他, NAR(1991)19:1954 および Bonaldo 他, Genome Research 6 (1996):791 の方法に基づく。 この大型分画ライブラリは、弾丸による負傷で死亡した39才白人男性の大動脈から単離されたRNAを用いて作製された。血清検査は、サイトメガロウイルス (CMV) が陽性であった。患者の病歴には、タバコの乱用 (25年間毎日1箱)、および時折のコカイン、マリファナ、アルコールの摂取がある。
HEAONOC01	PSPORT1	このノーマライズされ、プールされた心臓と未処理の心筋細胞組織ライブラリを、プールされた心臓と未処理の心筋細胞組織ライブラリからの百万の独立性情クロンから作製した。開始RNAは心肺停止で死亡した21才白人女性(ドナーA)から摘出した心臓組織、および16週目の白人胎児(ドナーB)から摘出した未処理の心筋細胞から作製した。ドナーAの病歴にはてんかん発作と死亡4ヶ月前の乳児出産が含まれる。患者の服用薬剤には不特定の経口避妊薬が含まれる。このライブラリは、極めて長時間(48時間/一回)の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他, Genome Research (1996) 6:791 を適応した条件を用いて2回にわたりノーマライズした。
HEARNON09	pBLUE(sk+)	ノーマライズした海馬ライブラリは、海馬組織ライブラリの113万個の独立性情クロンから作製した。RNAは、頭蓋内出血で死亡した72才白人女性の海馬組織から単離された。患者の病歴には鼻癌、高血圧および関節炎がある。ノーマライズ条件およびハイブリダイズ条件は、Soares 他 (PNAS (1994) 91:9228) を適用した。
HIPONON01	PSPORT1	

表 6 - 4

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
LATRTUT02	pINCY	ライブラリは 43 才白人男性の弁輪形成時に左心房から摘出した粘液腫から単離した RNA を用いて作成した。病理は心房性粘液腫を示した。患者の病歴には肺不全、急性心筋梗塞、アテローム性冠動脈疾患、高脂血症および喫煙がある。家族歴には良性高血圧症、急性心筋梗塞、アテローム性冠動脈疾患および II 型糖尿病がある。
LIVRTUE01	PCDNA2.1	この 5' に偏向しランダムプライムしたライブラリは、72 才白人男性の部分肝切除時に摘出された肝腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は転移性でグレード 2 (4 段階の内) の神経内分泌癌で、塊を形成していた。患者は転移性肝癌を有した。患者の病歴には良性高血圧、I 型糖尿病、前立腺肥大、前立腺癌、アルコールおよびタバコ濫用 (共に寛解期) がある。前に行われた手術には膵臓病変部除去、非観血的前立腺生検 (closed prostatic biopsy)、経尿道的前立腺切除、両側の精巣摘出および脾臓全摘が含まれる。患者の服用薬剤には、Eulexin、Hytrin、Proscar、エコトリン およびインスリンがある。家族歴には母親にアテローム性冠動脈疾患と急性心筋梗塞、父親にアテローム性冠動脈疾患と II 型糖尿病がある。
MENTNOT01	pINCY	ライブラリは 16 才の白人男性の遊離植皮術を伴った左脛骨の部分的骨切除時に左脛骨の半月板組織から単離された RNA を用いて作製した。顕微鏡検査にて、この組織は良性であることがわかった。左脛骨の近位の 7cm 以内に位置する随伴腫瘍の病理は転移性肺胞性横紋筋肉腫を示した。患者の病歴には赤血球の異常があった。患者の病歴には、骨関節炎 (変形性関節症) がある。

表 6 - 5

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
NERDTDN03 pINCY		このノーマライズされた後根神経節組織のライブラリは、或る後根神経節組織ライブラリの 105 万の独立クローンから作製した。開始 RNA は、急性肺水腫、急性気管支肺炎、両側性胸膜滲出、心嚢液貯留、及び悪性リンパ腫（ナチュラルキラー細胞タイプ）で死亡した 32 才の白人男性の頸椎から除去した後根神経節組織から作製された。当患者には、原因不明の発熱、倦怠感、疲労、及び胃腸出血があった。患者の病歴には、推定サイトメガロウイルス感染、肝臓鬱血、脂肪肝、脾腫、出血性膀胱炎、甲状腺出血、呼吸不全、左肺の肺炎、咽頭のナチュラルキラー細胞リンパ腫、ペル麻疹、及びタバコとアルコールの濫用等がある。過去の手術には、結腸内視鏡、閉鎖型結腸生検、アデノイド口蓋扁桃摘出、鼻咽腔内視鏡検査および生検等がある。患者の薬物療法には、Diflucan (fluconazole)、Deltasone (prednisone)、hydrocodone, Lorlab, アルプラゾラム (Alprazolam)、Reazodone, ProMace-Cytabom, Etoposide, シスプラチン (Cisplatin)、シタラピン (Cytarabine)、及びデキサメタゾン (dexamethasone) 等がある。
PANCNOE02 PCDNA2.1		当患者は放射線療法及び複数の輸血を受けた。このライブラリは、極めて長時間 (48 時間/一回) の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228 および Ronaldo 他, Genome Research (1996) 6:791 を適応した条件を用いて 2 回にわたりノーマライズした。
PENITUT01 pINCY		この 5' に偏向してランダムプライムされたライブラリは無酸素症で死亡した 8 歳黒人男性から採取された脾臓組織から単離した RNA を用いて作製した。血清検査は陰性だった。患者の使用薬剤としては DDAVP, versed, およびラベタロール (labetalol) 等があった。 ライブラリは 64 才の白人男性の陰茎から陰茎切断時に切除した腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理検査では、菌状に発育する侵襲度 4 の扁平上皮細胞癌が包皮の内壁にあり亀頭に及んでいた。患者の病歴には良性の大腸腫瘍、アテローム性冠動脈疾患、狭心症、痛風および肥満が含まれる。家族の病歴には、悪性咽頭腫瘍、慢性リンパ球性白血病および慢性肝臓病がある。
SCORNON02 PSPORT1		この標準化した背髄ライブラリは、或る背髄組織ライブラリの 324 万個の独立クローンから作製した。RNA を単離した背髄組織は、呼吸停止で死亡した 71 才の白人男性から採取した。患者の病歴には、心筋梗塞、壊疽、および末期腎臓病がある。ノーマライズ条件およびハイブリダイズ条件は、Soares 他 (PNAS (1994) 91:9228) を適用した。

40 30 20 10

表 6 - 6

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
SINTFER02	pINCY	このランダムプライムしたライブラリは、死亡した白人男子胎児から採取した小腸組織から単離した RNA を用いて作製された。死因は胎児性死亡である。
SINTNON02	pINCY	このノーマライズされた小腸組織ライブラリは、あるプールした小腸組織ライブラリの 184 万の独立クローン群から作製した。開始 RNA の作製には、6 名 (six) のドナーからの、プールした cDNA を用いた。cDNA の生成には、下記の組織から単離した mRNA を用いた。胎児性死亡の白人男子胎児 (ドナー A) から切除した小腸組織、無酸素症で死亡した 8 才の黒人男子 (ドナー B) から切除した小腸組織、頭部への発砲による損傷で死亡した 13 才の白人男子 (ドナー C) から切除した小腸組織、頭部外傷で死亡した 16 才の白人男子 (ドナー D) の小腸から切除した空腸および十二指腸、頭部外傷で死亡した 8 才白人女子 (ドナー E) から切除した回腸組織、および、閉鎖性頭部傷害で死亡した 15 才白人女子から切除した小腸組織である。血清検査は、ドナー A、B、C、D は陰性であった。ドナー E、F は、サイトメガロウイルス (CMV) に陽性の血清を持っていた。ドナー B の使用薬剤としては DDAVP, Versed, およびラベタロール (labetalol) 等があった。ドナー C は、以前にヘルニア修復などの手術を受けている。
SMCCNON03	pINCY	この患者が服用していた薬剤は無い。家族歴には、糖尿病が祖父母 (1 人以上) にある。ドナー D の病歴には、腎臓感染 (死亡 3 年前)、マリファナ使用、および喫煙がある。ドナー E の病歴には、片頭痛、および尿路感染が含まれる。以前に扁桃腺アデノイド切除術を受けている。患者の使用薬剤には、ジランチン (Dilantin)、フェニトイン)、アンセフ (Ancef)、セファロスポリン)、およびザンタック (Zantac、ラニチジン) が含まれる。ドナー F の病歴には、季節性アレルギーク群、およびマリファナ使用が含まれる。患者の使用薬剤にはドーパミン (Dopamine) とネオシネリン (Neo-Synephrine) がある。本ライブラリは、極めて長時間 (48 時間/一回) の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いた他は、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228、9932 および Bonaldo 他, Genome Research 6 (1996):791 を適応した条件を用いて 2 回にわたりノーマライズした。 このノーマライズされた平滑筋細胞ライブラリは、平滑筋細胞ライブラリからの 756 万の独立したクローンから作製した。開始 RNA は、3 才の白人男子の冠状動脈から除去した平滑筋細胞組織から作製した。ノーマライゼーションとハイブリダイゼーションの条件は、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228; Swaroop 他, NAR (1991) 19:1954; および Bonaldo 他 (Genome Research (1996) 6:791-806) から採用し、かなり長い (48 時間) 再アニーリングハイブリダイ

表 6 - 7

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
ゼーション期間を用いた。		
STOMFET01 pINCY		ライブラリは妊娠 20 週で死亡の白人女子胎児から採取した胃の組織から単離した RNA を用いて作製された。
STOMTDC01 PSPORT1		この大型分画ライブラリの作製には、3 名のドナーからプールした cDNA から作製した。cDNA の生成に用いた mRNA は、妊娠 23 週間の左心低形成症死産児(白人男子)(ドナーA)から除去した胃組織、61 才の男性(ドナーB)から除去した胃組織、61 才の白人男性(ドナーC)の食道部分切除、近位胃切除、幽門筋切開、および所属リンパ節切除時に除去した胃組織、から単離した。ドナーAの血清検査は陰性だった。ドナーB の場合は、病理は食道胃切除検体において生存可能な腫瘍の存在しないことが示された。ドナーC は欠乏性貧血と脊髄形成異常を示した。患者の服用薬剤には Epoetin、Danocrine、Berocca Plus 錠剤、Selenium、ビタミン B6 リン酸、ビタミン E とビタミン C、β カロチンが含まれる。
TESTNOT03 PBLUESCRIP T		ライブラリは肝疾患で死亡した 37 才の白人男性から採取した精巢組織から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴には、肝硬変、黄疸、肝不全があった。
TLYMNOT08 pINCY		ライブラリは、成人(40 - 50 才)の白人男性から抽出したアネルギー(無感作)性同種異系(anergicallogenic) T リンパ球組織から単離された RNA を用いて作製した。この細胞を 1 ミクログラム/ml の OKT3 mAb と 5 % のヒト血清の存在下で 3 日間インキュベートした。

表 7 - 1

プログラム	説明	参考文献	パラメータ閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して、 あいまいな塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder。アミノ酸配列または核酸配列の比較および注釈付けに有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列をアセンブリするプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool。アミノ酸配列および核酸配列の配列類似性検索に有用である。BLASTにはblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxの5つの機能がある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	EST: 確率値=1.0E-8 以下; 完全長配列確率値= 1.0E-10 以下
FASTA	問合せ配列と同種の配列群との類似性を検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最少5つの機能(fasta、tfasta、fastx、tfastxおよびssearch)がある。	Pearson, W.R. 及びD.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98, Smith, T.F. 及びM.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	EST:fasta E値 = 1.06E-6; アセンブリしたEST群:fasta 同一性=95%以上、一致長さ=200塩基以上、fastx E値 =1.0E-8以下、完全長配列fastxスコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびPFAM データベースの配列と対応させ、遺伝子ファミリー、配列相同性および系統的フィンガープリント領域を検索するBlocks IMProved Searcher。	Henikoff, S. 及びJ.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. 及びS. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Attwood, T.K. 他. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値= 1.0E-3以下

10

20

30

40

【表 7 - 2】

表 7 - 2

プログラム	説明	参照文献	パラメータ閾値
HMMER	問合せ配列を、タンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベース(PFAM, INCY, SMART, TIGRFAM等)に対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他. (1994) <i>J. Mol. Biol.</i> 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他. (1988) <i>Nucleic Acids Res.</i> 26:320-322; Durbin, R. 他. (1998) <i>Our World View, in a Nutshell</i> , Cambridge Univ. Press, 1-350.	PFAM, INCY, SMARTあるいはTIGRFAM ヒット: 確率値 = 1.0E-3以下、シグナルペプチドヒット: スコア=0以上
ProfileScan	Prosit で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列内の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他. (1988) <i>CABIOS</i> 4:61-66; Gribskov, M. 他. (1989) <i>Methods Enzymol.</i> 183:146-159; Bairoch, A. 他. (1997) <i>Nucleic Acids Res.</i> 25:217-221.	ノーマライズされた質スコア ≥ 特定の Prosit モチーフに対する GCG 指定 [HIGH] 値通常、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度と確率で自動配列決定機トレースを調べるベースコーリングアルゴリズム。	Ewing, B. 他. (1998) <i>Genome Res.</i> 8:175-185; Ewing, B. および Green (1998) <i>Genome Res.</i> 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づく SWAT や CrossMatch を含む Phis Revised Assembly プログラムで、配列相同性の検索や DNA 配列のアセンブリに有用である。	Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) <i>Adv. Appl. Math.</i> 2:482-489; Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) <i>J. Mol. Biol.</i> 147:195-197; および Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア = 120 以上; マッチ長 = 56 以上
Consed	Phrap アセンブリの表示および編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他. (1998) <i>Genome Res.</i> 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンして、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み行列解析プログラム。	Nielson, H. 他. (1997) <i>Protein Engineering</i> 10:1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) <i>CABIOS</i> 12:431-439.	スコア = 3.5 以上
TMAP	重み行列を用いて蛋白配列での膜貫通セグメントを描写し配向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) <i>J. Mol. Biol.</i> 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) <i>Protein Sci.</i> 5:363-371.	

2005514917000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/32032
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07K 14/475 , A61K 38/18 US CL : 530/350; 512/12		
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) U.S. : 530/350; 512/12		
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 01/077169 A2 (HYSEQ INC.) 08 October 2001 (08.10.2001), entire document, see figure 2 (aa 3-96 of SEQ ID NO:10 share 100% identity to SEQ ID NO:1).	1, 17, 19
X	The Merck Index. Eighth Edition. 1968 Rahway:New Jersey. page 497, see glutamine as fragment having biological activity.	1, 17, 19
X	KAMATA et al. Molecular cloning of a novel gene expressing in dorsal part of neural tube with thrombospondin type1 domain. Society for Neuroscience Abstracts, 1998, Vol. 24, No. 1, page 1032, entire document. Reports discovery of R spondin (protein of Rf. 1 above and Genbank Accession No. QRZ132, below)	1, 3, 6, 7, 17
X	Database Genbank, (Bethesda, Md.) National Library of Medicine, Accession No. AB016768, 01 May 1999, .KAMATA et al. , overall 80.6% query match; amino acids 3-96 identical to amino acids 21-114 of SEQ ID NO:1.	1, 3, 17
X	Database Genbank, (Bethesda Md.), National Library of Medicine, Accession No. AC007279, 30 September 2000. SULSTON et al. nucleotides 19848-19777 100% identical to nt. 2734-3805 of SEQ ID NO:33.	13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" 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 application or patent 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 11 April 2003 (11.04.2003)		Date of mailing of the international search report 15 OCT 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Gabriele E. BUGAISKY <i>Janice Ford for</i> Telephone No. 708 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/32032

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
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:
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation 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.: 1-7, 12-13, 17-18, 56 and 88, only for SEQ ID NOs 1 and 33
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.:
- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/32032

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

- I. Polypeptide of SEQ ID NO:1, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 56.
- II. Polypeptide of SEQ ID NO:2, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 57.
- III. Polypeptide of SEQ ID NO:3, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 58.
- IV. Polypeptide of SEQ ID NO:4, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 59.
- V. Polypeptide of SEQ ID NO:5, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 60.
- VI. Polypeptide of SEQ ID NO:6, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 61.
- VII. Polypeptide of SEQ ID NO:7, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 62.
- VIII. Polypeptide of SEQ ID NO:8, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 63.
- IX. Polypeptide of SEQ ID NO:9, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 64.
- X. Polypeptide of SEQ ID NO:10, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 65.
- XI. Polypeptide of SEQ ID NO:11, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 66.
- XII. Polypeptide of SEQ ID NO:12, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 67.
- XIII. Polypeptide of SEQ ID NO:13, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 68.
- XIV. Polypeptide of SEQ ID NO:14, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 69.
- XV. Polypeptide of SEQ ID NO:15, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 70.
- XVI. Polypeptide of SEQ ID NO:16, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 71.
- XVII. Polypeptide of SEQ ID NO:17, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 72.
- XVIII. Polypeptide of SEQ ID NO:18, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 73.
- XIX. Polypeptide of SEQ ID NO:19, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 74.
- XX. Polypeptide of SEQ ID NO:20 compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 75.
- XXI. Polypeptide of SEQ ID NO:21, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 76.
- XXII. Polypeptide of SEQ ID NO:22, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 77.
- XXIII. Polypeptide of SEQ ID NO:23, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 78.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/32032

- XXIV. Polypeptide of SEQ ID NO:24, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 79.
- XXV. Polypeptide of SEQ ID NO:25, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 80.
- XXVI. Polypeptide of SEQ ID NO:26, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 81.
- XXVII. Polypeptide of SEQ ID NO:27, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 82.
- XXVIII. Polypeptide of SEQ ID NO:28, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 83.
- XXIX. Polypeptide of SEQ ID NO:29, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 84.
- XXX. Polypeptide of SEQ ID NO:30, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 85.
- XXXI. Polypeptide of SEQ ID NO:31, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 86.
- XXXII. Polypeptide of SEQ ID NO:32, compositions comprising such and method of pharmaceutical treatment, claims 1-2, 17-18 and 87.
- XXXIII. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:1, claims 3-7, 12, 13 and 88.
- XXXIV. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:2, claims 3-7, 12, 13 and 89.
- XXXV. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:3, claims 3-7, 12, 13 and 90.
- XXXVI. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:4, claims 3-7, 12, 13 and 91.
- XXXVII. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:5, claims 3-7, 12, 13 and 92.
- XXXVIII. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:6, claims 3-7, 12, 13 and 93.
- XXXIX. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:7, claims 3-7, 12, 13 and 94.
- XXXX. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:8, claims 3-7, 12, 13 and 95.
- XXXXI. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:9, claims 3-7, 12, 13 and 96.
- XXXXII. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:10, claims 3-7, 12, 13 and 97.
- XXXXIII. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:11, claims 3-7, 12, 13 and 98.
- XXXXIV. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:12, claims 3-7, 12, 13 and 99.
- XXXXV. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:13, claims 3-7, 12, 13 and 100.
- XXXXXVI. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:14, claims 3-7, 12, 13 and 101.
- XXXXXVII. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:15, claims 3-7, 12, 13 and 102.
- XXXXXVIII. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:16, claims 3-7, 12, 13 and 103.
- XXXXXIX. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:17, claims 3-7, 12, 13 and 104.
50. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:18, claims 3-7, 12, 13 and 105.
51. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:19, claims 3-7, 12, 13 and 106.
52. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:20, claims 3-7, 12, 13 and 107.
53. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:21, claims 3-7, 12, 13 and 108.
54. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:22, claims 3-7, 12, 13 and 109.
55. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:23, claims 3-7, 12, 13 and 110.
56. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:24, claims 3-7, 12, 13 and 111.
57. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:25, claims 3-7, 12, 13 and 112.
58. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:26, claims 3-7, 12, 13 and 113.
59. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:27, claims 3-7, 12, 13 and 114.
60. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:28, claims 3-7, 12, 13 and 115.
61. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:29, claims 3-7, 12, 13 and 116.
62. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:30, claims 3-7, 12, 13 and 117.
63. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:31, claims 3-7, 12, 13 and 118.
64. Polynucleotide encoding SEQ ID NO:32, claims 3-7, 12, 13 and 119.
65. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:1, claim 8.
66. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:2, claim 8.
67. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:3, claim 8.
68. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:4, claim 8.
69. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:5, claim 8.
70. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:6, claim 8.
71. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:7, claim 8.
72. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:8, claim 8.
73. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:9, claim 8.
74. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:10, claim 8.
75. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:11, claim 8.
76. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:12, claim 8.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/32032

77. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:13, claim 8.
78. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:14, claim 8.
79. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:15, claim 8.
80. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:16, claim 8.
81. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:17, claim 8.
82. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:18, claim 8.
83. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:19, claim 8.
84. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:20, claim 8.
85. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:21, claim 8.
86. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:22, claim 8.
87. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:23, claim 8.
88. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:24, claim 8.
89. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:25, claim 8.
90. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:26, claim 8.
91. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:27, claim 8.
92. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:28, claim 8.
93. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:29, claim 8.
94. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:30, claim 8.
95. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:31, claim 8.
96. Transgenic organism comprising polynucleotide encoding SEQ ID NO:32, claim 8.
97. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:1, claims 9 and 10.
98. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:2, claims 9 and 10.
99. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:3, claims 9 and 10.
100. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:4, claims 9 and 10.
101. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:5, claims 9 and 10.
102. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:6, claims 9 and 10.
103. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:7, claims 9 and 10.
104. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:8, claims 9 and 10.
105. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:9, claims 9 and 10.
106. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:10, claims 9 and 10.
107. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:11, claims 9 and 10.
108. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:12, claims 9 and 10.
109. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:13, claims 9 and 10.
110. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:14, claims 9 and 10.
111. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:15, claims 9 and 10.
112. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:16, claims 9 and 10.
113. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:17, claims 9 and 10.
114. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:18, claims 9 and 10.
115. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:19, claims 9 and 10.
116. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:20, claims 9 and 10.
117. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:21, claims 9 and 10.
118. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:22, claims 9 and 10.
119. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:23, claims 9 and 10.
120. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:24, claims 9 and 10.
121. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:25, claims 9 and 10.
122. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:26, claims 9 and 10.
123. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:27, claims 9 and 10.
124. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:28, claims 9 and 10.
125. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:29, claims 9 and 10.
126. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:30, claims 9 and 10.
127. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:31, claims 9 and 10.
128. Recombinant method of production of protein of SEQ ID NO:32, claims 9 and 10.
129. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:1, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
130. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:2, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
131. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:3, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
132. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:4, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
133. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:5, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
134. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:6, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
135. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:7, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
136. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:8, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
137. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:9, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.
138. Antibodies directed against the protein of SEQ ID NO:10, claims 11, 31-32, 34, 37-38, and 40-43.

PCT/US02/32032

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

201. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:9, claims 20, 23, 27.
202. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:10, claims 20, 23, 27.
203. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:11, claims 20, 23, 27.
204. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:12, claims 20, 23, 27.
205. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:13, claims 20, 23, 27.
206. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:14, claims 20, 23, 27.
207. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:15, claims 20, 23, 27.
208. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:16, claims 20, 23, 27.
209. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:17, claims 20, 23, 27.
210. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:18, claims 20, 23, 27.
211. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:19, claims 20, 23, 27.
212. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:20, claims 20, 23, 27.
213. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:21, claims 20, 23, 27.
214. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:22, claims 20, 23, 27.
215. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:23, claims 20, 23, 27.
216. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:24, claims 20, 23, 27.
217. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:25, claims 20, 23, 27.
218. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:26, claims 20, 23, 27.
219. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:27, claims 20, 23, 27.
220. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:28, claims 20, 23, 27.
221. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:29, claims 20, 23, 27.
222. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:30, claims 20, 23, 27.
223. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:31, claims 20, 23, 27.
224. Screening methods for modulators of the protein of SEQ ID NO:32, claims 20, 23, 27.
225. Modulators of the protein of SEQ ID NO:1, claims 21 and 24.
226. Modulators of the protein of SEQ ID NO:2, claims 21 and 24.
227. Modulators of the protein of SEQ ID NO:3, claims 21 and 24.
228. Modulators of the protein of SEQ ID NO:4, claims 21 and 24.
229. Modulators of the protein of SEQ ID NO:5, claims 21 and 24.
230. Modulators of the protein of SEQ ID NO:6, claims 21 and 24.
231. Modulators of the protein of SEQ ID NO:7, claims 21 and 24.
232. Modulators of the protein of SEQ ID NO:8, claims 21 and 24.
233. Modulators of the protein of SEQ ID NO:9, claims 21 and 24.
234. Modulators of the protein of SEQ ID NO:10, claims 21 and 24.
235. Modulators of the protein of SEQ ID NO:11, claims 21 and 24.
236. Modulators of the protein of SEQ ID NO:12, claims 21 and 24.
237. Modulators of the protein of SEQ ID NO:13, claims 21 and 24.
238. Modulators of the protein of SEQ ID NO:14, claims 21 and 24.
239. Modulators of the protein of SEQ ID NO:15, claims 21 and 24.
240. Modulators of the protein of SEQ ID NO:16, claims 21 and 24.
241. Modulators of the protein of SEQ ID NO:17, claims 21 and 24.
242. Modulators of the protein of SEQ ID NO:18, claims 21 and 24.
243. Modulators of the protein of SEQ ID NO:19, claims 21 and 24.
244. Modulators of the protein of SEQ ID NO:20, claims 21 and 24.
245. Modulators of the protein of SEQ ID NO:21, claims 21 and 24.
246. Modulators of the protein of SEQ ID NO:22, claims 21 and 24.
247. Modulators of the protein of SEQ ID NO:23, claims 21 and 24.
248. Modulators of the protein of SEQ ID NO:24, claims 21 and 24.
249. Modulators of the protein of SEQ ID NO:25, claims 21 and 24.
250. Modulators of the protein of SEQ ID NO:26, claims 21 and 24.
251. Modulators of the protein of SEQ ID NO:27, claims 21 and 24.
252. Modulators of the protein of SEQ ID NO:28, claims 21 and 24.
253. Modulators of the protein of SEQ ID NO:29, claims 21 and 24.
254. Modulators of the protein of SEQ ID NO:30, claims 21 and 24.
255. Modulators of the protein of SEQ ID NO:31, claims 21 and 24.
256. Modulators of the protein of SEQ ID NO:32, claims 21 and 24.
257. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:1, claims 22 and 25.
258. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:2, claims 22 and 25.
259. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:3, claims 22 and 25.
260. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:4, claims 22 and 25.
261. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:5, claims 22 and 25.
262. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:6, claims 22 and 25.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/32032

263. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:7, claims 22 and 25.
264. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:8, claims 22 and 25.
265. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:9, claims 22 and 25.
266. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:10, claims 22 and 25.
267. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:11, claims 22 and 25.
268. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:12, claims 22 and 25.
269. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:13, claims 22 and 25.
270. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:14, claims 22 and 25.
271. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:15, claims 22 and 25.
272. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:16, claims 22 and 25.
273. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:17, claims 22 and 25.
274. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:18, claims 22 and 25.
275. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:19, claims 22 and 25.
276. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:20, claims 22 and 25.
277. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:21, claims 22 and 25.
278. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:22, claims 22 and 25.
279. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:23, claims 22 and 25.
280. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:24, claims 22 and 25.
281. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:25, claims 22 and 25.
282. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:26, claims 22 and 25.
283. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:27, claims 22 and 25.
284. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:28, claims 22 and 25.
285. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:29, claims 22 and 25.
286. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:30, claims 22 and 25.
287. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:31, claims 22 and 25.
288. Pharmaceutical treatment with modulators of the protein of SEQ ID NO:32, claims 22 and 25.
289. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:1, claim 26.
290. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:2, claim 26.
291. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:3, claim 26.
292. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:4, claim 26.
293. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:5, claim 26.
294. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:6, claim 26.
295. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:7, claim 26.
296. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:8, claim 26.
297. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:9, claim 26.
298. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:10, claim 26.
299. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:11, claim 26.
300. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:12, claim 26.
301. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:13, claim 26.
302. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:14, claim 26.
303. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:15, claim 26.
304. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:16, claim 26.
305. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:17, claim 26.
306. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:18, claim 26.
307. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:19, claim 26.
308. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:20, claim 26.
309. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:21, claim 26.
310. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:22, claim 26.
311. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:23, claim 26.
312. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:24, claim 26.
313. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:25, claim 26.
314. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:26, claim 26.
315. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:27, claim 26.
316. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:28, claim 26.
317. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:29, claim 26.
318. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:30, claim 26.
319. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:31, claim 26.
320. Screening methods for ligands of the protein of SEQ ID NO:32, claim 26.
321. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:1, claim 28.
322. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:2, claim 28.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/32032

323. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:3, claim 28.
324. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:4, claim 28.
325. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:5, claim 28.
326. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:6, claim 28.
327. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:7, claim 28.
328. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:8, claim 28.
329. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:9, claim 28.
330. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:10, claim 28.
331. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:11, claim 28.
332. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:12, claim 28.
333. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:13, claim 28.
334. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:14, claim 28.
335. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:15, claim 28.
336. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:16, claim 28.
337. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:17, claim 28.
338. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:18, claim 28.
339. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:19, claim 28.
340. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:20, claim 28.
341. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:21, claim 28.
342. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:22, claim 28.
343. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:23, claim 28.
344. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:24, claim 28.
345. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:25, claim 28.
346. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:26, claim 28.
347. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:27, claim 28.
348. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:28, claim 28.
349. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:29, claim 28.
350. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:30, claim 28.
351. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:31, claim 28.
352. Screening methods for compounds which alter the expression of polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:32, claim 28.
353. Methods of assessing toxicity of compounds using polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:1, claim 29.
354. Methods of assessing toxicity of compounds using polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:2, claim 29.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/32032

- 603. Expression profiling using microarray comprising polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:27, claim 47
- 604. Expression profiling using microarray comprising polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:28, claim 47
- 605. Expression profiling using microarray comprising polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:29, claim 47
- 606. Expression profiling using microarray comprising polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:30, claim 47
- 607. Expression profiling using microarray comprising polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:31, claim 47
- 608. Expression profiling using microarray comprising polynucleotides encoding the protein of SEQ ID NO:32, claim 47

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The proteins all have different primary structures and functions. PCT Rules 13.1-13.2 do not provide for multiple products and methods of use.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

SEQUENCE Databases A-Geneseq_101002, Issued Patents_AA, Published Applications_AA, PIR-73, Swissprot 40, SPTREMBL-21, N-Geneseq-101002, Issued Patents_NA, GenEmbl, EST:*, Published Applications_NA, Dialog files 155, 5 (Medline, Biosis)
Search terms: SEQ ID NO:1, 33, thrombospondin, spondin

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/16	4 B 0 6 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/18	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P 9/08	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 9/10	1 0 3
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/06	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/02	1 0 3
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/20	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 25/20	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 16/18	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 M 1/00	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 1/21	

C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 15/00	C
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 5/00	A

(31)優先権主張番号 60/332,426

(32)優先日 平成13年11月16日(2001.11.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ワレン、ブリジット・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 2 4・エンシニタス・#ビー1 0 3・サウスエルカミーノ
レアル 1 8 1 0

(72)発明者 レーア・メイソン、パトリア・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 0 1 4・モーガンヒル・クラークレーン 3 6 0

(72)発明者 トラン、ユエン・ケイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 3 3・サンノゼ・メイブリースクエア 2 6 3 8

(72)発明者 ダガン、ブレンダン・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 6・サニーベイル・#3 0 6・ブエナビスタアベニュー
2 4 3

(72)発明者 サンガベル、カピサ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 4 3・マウンテンビュー・#2 3・モンテシトアベニュー
1 9 5 0

(72)発明者 ヤング、ジュンミン
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 9・サンノゼ・パークレーン 7 1 2 5

(72)発明者 スー、ユーミン
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 4 0・マウンテンビュー・ウォルナットドライブ 1 7 3
9

(72)発明者 タング、トム・ワイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 1 8・サンノゼ・ランウィックコート 4 2 3 0

(72)発明者 チョーラ、ナリンダー・ケイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 8 7・ユニオンシティ・#7 1 2・ユニオンスクエア 3
3

(72)発明者 エリオット、ビッキー・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 1・サンノゼ・ポルトンブレイスウェイ 3 7 7 0

(72)発明者 フォーサイス、イアン・ジェイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 6 1・レッドウッドシティ・ローブルアベニュー 3 0 8

- (72)発明者 ベチャ、シャニア・ディー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 4 6・カストロバレー・# 1 1 7・ゲイリードライブ 2
1 0 6 2
- (72)発明者 ヤオ、モニック・ジー
アメリカ合衆国インディアナ州4 6 0 3 3・カーメル・ウッドゲートドライブ 1 1 8 9
- (72)発明者 エマーリング、ブルック・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 3・パロアルト・# 7 1・ウッドランドアベニュー 1
7 3 5
- (72)発明者 グリフィン、ジェニファー・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 5・フレモント・メローウェイ 3 3 6 9 1
- (72)発明者 ラル、プリーティ・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 0 5 6・サンタクララ・ピーオーボックス 5 1 4 2
- (72)発明者 ゼバージャディアン、イエガナー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 2 7・サンフランシスコ・ジュニペロセラブルバード
8 3 0
- (72)発明者 ボーグン、マライア・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 7 7・サンレアンドロ・サンティアゴロード 1 4 2 4 4
- (72)発明者 リー、アーンステイン・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 2・カストロバレー・クロウクリークロード 2 0 5 2
3
- (72)発明者 リー、ソー・ユーン
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 1 5・デイリーシティ・ウエストデールアベニュー 4 0
- (72)発明者 ランクマール、ジャヤラクシミ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 5・フレモント・メイバードサークル 3 4 3 5 9
- (72)発明者 ゴーバッド、アン・イー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 0・リバモア・マリーコモン 3 6 9
- (72)発明者 ケーブル、エイミー・イー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 0 9・サンフランシスコ・# 4・ポークストリート 2 3
4 5
- (72)発明者 リュ、デュング・アイナ・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 3・サンノゼ・コイドライブ 2 3 3
- (72)発明者 ボロースキー、マーク・エル
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 6 1・レッドウッドシティ・オーチャードアベニュー 1
2 2

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 AA19 BA80 CA04 CA09 DA02 DA05 DA06 DA11
DA12 EA04 GA05 GA11 HA12
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QQ53 QR08 QR42 QR56 QS25
QS34 QS39 QX02
4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA17 BA01 BA02 BA20 BA22 BA23
BA44 CA53 NA14 ZA022 ZA082 ZA152 ZA162 ZA202 ZA222 ZA232
ZA242 ZA362 ZA372 ZA392 ZA402 ZA422 ZA452 ZA512 ZA532 ZA542
ZA552 ZA592 ZA622 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962
ZA972 ZB072 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB312 ZB332 ZB352 ZB372
ZC352 ZC412
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50

FA72 FA74

专利名称(译)	分泌蛋白质		
公开(公告)号	JP2005514917A	公开(公告)日	2005-05-26
申请号	JP2003532655	申请日	2002-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	ユエヘンリー ワレンブリジットエイ レーアメイソンパトリシアエム トランユエンケイ ダガンブレンダンエム サンガベルカピサ ヤングジュンミング スーユーミング タングトムワイ チョーラナリンダーケイ エリオットビッキーエス フォーサイスイアンジェイ ベチャシャニアディー ヤオモニークジー エマーリングブルックエム グリフィンジェニファーエイ ラルプリーティジー ゼバージャディアンイエガネー ボーグンマライアアール リーアーンステイーンエイ リーソーユーン ランクマールジャヤラクシミ ゴーバッドアンイー ケーブルエイミーイー リュデュングアイナエム ボロースキーマークエル		
发明人	ユエ、ヘンリー ワレン、ブリジット・エイ レーア・メイソン、パトリシア・エム トラン、ユエン・ケイ ダガン、ブレンダン・エム サンガベル、カピサ ヤング、ジュンミング スー、ユーミング タング、トム・ワイ チョーラ、ナリンダー・ケイ エリオット、ビッキー・エス フォーサイス、イアン・ジェイ ベチャ、シャニア・ディー ヤオ、モニーク・ジー エマーリング、ブルック・エム グリフィン、ジェニファー・エイ ラル、プリーティ・ジー ゼバージャディアン、イエガネー		

ボーゲン、マライア・アール
リー、アーンステーン・エイ
リー、ソー・ユーン
ランクマール、ジャヤラクシミ
ゴバッド、アン・イー
ケーブル、エイミー・イー
リュ、デュング・アイナ・エム
ボロースキー、マーク・エル

IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/04 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N37/00
CPC分类号	A01K2217/05 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/04 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C12N9/6421
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/04 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/10.103 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/02 A61P25/02.103 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 A61K37/02 C12N15/00.C C12N15/00.F C12N5/00.A
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA05 4B024/GA11 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA082 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA202 4C084/ZA222 4C084/ZA232 4C084/ZA242 4C084/ZA362 4C084/ZA372 4C084/ZA392 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA532 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA622 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB312 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB372 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74
優先権	60/326945 2001-10-03 US 60/343718 2001-10-19 US 60/343980 2001-11-02 US 60/332426 2001-11-16 US

摘要(译)

本发明的各种实施方案提供了鉴定和编码SECP的人分泌蛋白 (SECP) 和多核苷酸。 本发明的实施方案还提供表达载体, 宿主细胞, 抗体, 激动剂和拮抗剂。 其他实施方案提供了用于诊断, 治疗或预防与SECP异常表达有关的疾病的方法。

特許庁

(P2005-514917A)

(43) 公表日 平成17年5月26日 (2005. 5. 26)

(51) Int. Cl. 7	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 1/00	4 B 0 2 9
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 3
		4 B 0 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 144 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-532655 (P2003-532655)	(71) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成14年10月3日 (2002. 10. 3)		インサイト・ゲノミクス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月31日 (2004. 5. 31)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 4 ・パロアルト・ボータードライブ 3 1 6 0
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/032032	(74) 代理人	100089266
(87) 国際公開番号	W02003/029437		弁理士 大島 陽一
(87) 国際公開日	平成15年4月10日 (2003. 4. 10)	(72) 発明者	ユエ、ヘンリー
(31) 優先権主張番号	60/326, 945		アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 7 ・サニーバイル・ルイスアベニュー 8 2 6
(32) 優先日	平成13年10月3日 (2001. 10. 3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/343, 718		
(32) 優先日	平成13年10月18日 (2001. 10. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/343, 980		
(32) 優先日	平成13年11月2日 (2001. 11. 2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く