

(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2005-528079

(P2005-528079A)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	B 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	J 4 B O 2 9
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 112 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-570697 (P2002-570697)	(71) 出願人	301005050 インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) (22) 出願日	平成14年3月5日(2002.3.5)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月2日(2003.9.2)	(72) 発明者	ユエ、ヘンリー アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サニーバイル・ルイスアベニュー 826
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/007719	(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95129・サンノゼ・パークレーン 7125
(87) 国際公開番号	W02002/070669		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成14年9月12日(2002.9.12)		
(31) 優先権主張番号	60/273, 946		
(32) 優先日	平成13年3月6日(2001.3.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/276, 873		
(32) 優先日	平成13年3月16日(2001.3.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/280, 531		
(32) 優先日	平成13年3月30日(2001.3.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 分泌タンパク質

(57) 【要約】

本発明はヒトの分泌タンパク質(SECP)、およびSECP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。本発明はまた、SECP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】

以下の(a)乃至(e)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:1-23(配列番号1乃至23)を有す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:2-23を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一であるような天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド

(c) SEQ ID NO:1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有するポリペプチド

(d) SEQ ID NO:1-23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 10

(e) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】

請求項1のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【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。 20

【請求項5】

SEQ ID NO:24-46(配列番号24乃至46)を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有する、請求項4に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】

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

【請求項7】

請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項8】

請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。 30

【請求項9】

請求項1のポリペプチドを生産する方法であって、

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

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程。

【請求項10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を持つことを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

請求項1に記載のポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体。 40

【請求項12】

以下の(a)乃至(g)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:24-46を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO:25-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%が同一であるような天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド

(c) SEQ ID NO:24のポリヌクレオチド配列に対して少なくとも92%が同一であるような天然ポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(d) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド 50

(e) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(f) (c) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(g) (a) ~ (f) のRNA等価物

【請求項13】

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

【請求項14】

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

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて、そのプローブと前記標的ポリヌクレオチド、また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条件下で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存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたは断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。

【請求項15】

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

【請求項16】

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

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまた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またはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまた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17】

請求項1に記載のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項18】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項17の組成物。

【請求項19】

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17の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項20】

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

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項21】

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

【請求項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含むことを特徴とする治療方法。

【請求項23】

10

20

30

40

50

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

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

【請求項 2 4】

請求項 23 に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項 2 5】

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含むことを特徴とする治療方法。 10

【請求項 2 6】

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

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

【請求項 2 7】

請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、 20

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

【請求項 2 8】

請求項 5 の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、 30

- (a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
- (b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、
- (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 2 9】

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) 処理した前記生体サンプルの核酸と、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含むプローブをハイブリダイズさせるステップであって、このハイブリダイゼーションゼーションが、前記プローブと前記生体サンプル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また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、前記ステップと、
- (c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、
- (d) 前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリダ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前記ハイブリダ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前記ハイブリダイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法 40 50

【請求項30】

生物学的サンプル中のSECPの発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、

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

(b) 前記複合体を検出する過程とを含み、前記複合体の存在が、前記生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。

【請求項31】

前記抗体が、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

(c) Fab断片

(d) F(ab')₂断片

(e) ヒト化抗体 のいずれかであることを特徴とする請求項11に記載の抗体。

【請求項32】

請求項11に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む組成

【請求項33】

被験者のSECP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SECP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。

【請求項36】

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

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列含むポリペプチドまたはその免疫原性断片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:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項37】

請求項36に記載の方法で産出したポリクローナル抗体。

【請求項38】

請求項37に記載のポリクローナル抗体及び適切なキャリアーを含む組成物。

【請求項39】

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

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列含むポリペプチドまたはその免疫原性断片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) 不死化の細胞を用いて前記抗体産出細胞を融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合するようなモノクローナル抗体を前記培養から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項40】

請求項39に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

請求項40に記載のモノクローナル抗体及び適切なキャリアーを含む組成物。

【請求項 4 2】

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

【請求項 4 3】

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

【請求項 4 4】

SEQ ID NO:1-23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) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項11に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、SEQ ID NO:1-23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がサンプル中に存在することを示唆することを特徴とする方法。

【請求項 4 5】

SEQ ID NO:1-23 からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項11に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 4 6】

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

【請求項 4 7】

ポリヌクレオチドを含むサンプルの発現プロフィールを作成する方法であって、

(a) サンプルのポリヌクレオチドを標識するステップと、

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

(c) サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量するステップとを含むサンプルの転写イメージを作製する方法。

【請求項 4 8】

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含むアレイであって、少なくとも1つの前記ヌクレオチド分子が、標的ポリヌクレオチドの少なくとも30の連続したヌクレオチドと特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを有し、前記の標的ポリヌクレオチドが請求項12に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするアレイ。

【請求項 4 9】

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また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。

【請求項 5 0】

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また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 5 1】

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またはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

10

20

30

40

50

【請求項 5 2】

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 5 3】

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

【請求項 5 4】

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

【請求項 5 5】

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

10

【請求項 5 6】

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 5 7】

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 5 8】

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。

20

【請求項 5 9】

SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 6 0】

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 6 1】

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 6 2】

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 6 3】

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。

30

【請求項 6 4】

SEQ ID NO:9のアミノ酸配列を有する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 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。

40

【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。

【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】

50

SEQ ID NO:43のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項99】

SEQ ID NO:44のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項100】

SEQ ID NO:45のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【請求項101】

SEQ ID NO:46のポリヌクレオチド配列を有する請求項12に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分泌タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した、細胞増殖異常、自己免疫/炎症疾患、心血管障害、神経障害、および発生障害の診断・治療・予防に関する。本発明は更に、分泌タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価に関する。

【背景技術】

【0002】

タンパク質の輸送および分泌は、細胞機能のために必須である。タンパク質の輸送は、輸送また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、また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シングイベントによって活性化される。そのようなイベントの例として、グリコシル化、タンパク質分解、およ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とフォールディング、および受容体若しくは細孔複合体を有する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、膜貫通受容体およ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、成長因子および分化因子、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、およ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, 582-592ページの概説を参照)。

【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抗原類が同定す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

10

20

30

40

50

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、および維持において機能し、炎症反応の重要な介在物質および制御因子として働く。MPの発現およびバランスは、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変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、および活性化に影響を与える。MPは、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、それらのドメインの内に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、およびフィブロネクチン様ドメインが含まれ得る。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)、ピトロネクチンおよ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、およびインテグリンがある(概説に関しては、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. および Nelson, W. J. (1997) *BioEssays* 19:47-55を参照)。

10

【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、および細胞認識である。MUC6はヒトの胃ムチンであり、胆嚢、膵臓、精液小胞、およ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)。ヘモムチンは新規なショウジョウバエ表面ムチンであり、抗菌エフェクター分子の誘導に関与し得る(Theopold, U. 他(1996) *J. Biol. Chem.* 271:12708-12715)。

20

【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、エナメルリンおよびアメロプラスチンである。これらの成分タンパク質群からのエナメル細胞外基質の構築は、無機質置換を受けるのに適格な基質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.* 38:257-267)。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知られている(Deutsch D. 他(1998) *Connect Tissue Res.* 39:177-184)。

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、それも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)タンパク質は眼において発現され、緑内障の病原と関連している(Kulkarni, N.H. 他(2000) *Genet. Res.* 76:41-50)。Yokoyama 他(1996)による研究では、ラット神経細胞のオルファクトメジンに関連し、ERに局在するタンパク質と96%の配列同一性を有するAMYと呼ばれる135アミノ酸のタンパク質が神経芽細胞腫細胞系cDNAライブラリで発見され、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)。

40

50

【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およ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。構造的には、成熟したタンパク質は長さが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システインリッチドメインによって定義される古代のタンパク質スーパーファミリに極めて類似するドメインを示す(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、初代腫瘍サンブ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 他(1994)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。この免疫刺激の原因は、発癌性形質転換、ウイルス感染または病原性侵襲であると提起されている(Ullrich, A., 他(1994) J. Biol. Chem. 269:18401-18407)。

10

【0009】

セマフォリン類は少なくとも30の異なるメンバーからなる軸索誘導分子の大きなグループであり、脊椎動物、非脊椎動物、更にはある種のウィルスにおいても見つかっている。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(neuropilin)は、*in vitro*で神経突起の生成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)、および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モチーフおよび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、更にセマドメインおよびC末端ドメインを介してセマフォリン類の結合に関与していると考えられる(Raper, J.A.(2000) Curr. Opin. Neurobiol. 10:8894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され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)。

20

30

【0010】

ヒト妊娠特異的 1糖タンパク質(PSG)は、分子量が72KDa、64KDa、62KDaおよび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1サブファミリーを構成する(Plouzek C.A. および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、およ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】

自己分泌型運動促進因子(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は決定的に重要である。自己分泌型運動促進因子受容体(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発見された(Ohta 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。

40

【0012】

ホルモンは、血液循環により運ばれ、標的細胞の表面のまた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んで、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また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

50

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）およびヒスタミンが、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、およ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）。

【0013】

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（ α -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。 α -メラニン細胞刺激ホルモン（ α -MSH）と副腎皮質刺激ホルモン様中葉ペプチド（CLIP）はACTHから形成され、 α -リポトロピン（ α -LPH）と β -エンドルフィン（ β -END）は α -LPHのペプチド成分であるが、 α -MSHは α -LPH中に含有される。ACTH欠乏による副腎不全は、POMCのエキソン2および3における遺伝子突然変異に起因しており、早期発症肥満症、副腎不全および赤毛色素沈着を特徴とする、内分泌障害を生じる（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）。

10

20

【0014】

成長因子類および分化因子類は、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、また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、細胞シグナル伝達および細胞運動性を刺激または抑制する、細胞内信号伝達経路の引き金となる。殆どの成長および分化因子は、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）。成長因子類および分化因子類には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、およ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、およびそれらの幹細胞前駆体など、血液細胞の増殖および分化を刺激する。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、およ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。

30

【0015】

成長因子および分化因子は、in vitroでの細胞の腫瘍性転換、および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、腫瘍の血管新生およ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は、貧血、白血病、およ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およびin vivoの双方で、腫瘍細胞群に対し細胞毒性を持つ。更に、幾つかの成長因子およ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およ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）。

40

【0016】

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およ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

50

、Slit-2、Slit-3 およびラット 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様モチーフおよ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-1 mRNA、Slit-2 mRNA および Slit-3 mRNAは、それぞれ脳、脊髄、甲状腺に発現される (Itoh, A. 他、上記)。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、それらの相互作用は中枢神経系の組織発生時の幾つかの段階において重要であり得ると示唆される (Liang, Y. 他 (1999) J. Biol. Chem. 274:17885-17892)。

【 0 0 1 7 】

神経ペプチドおよび血管介在物質 (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、神経ペプチドおよ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および平滑筋刺激に関する関連ペプチド類、バソプレッシン、およ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、およびガストリンがある。NP/VMは直接に信号を伝達し得る他、別の神経伝達物質およ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機能することができる。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)。

【 0 0 1 8 】

NP/VMは、多くの神経障害およ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およびプロラクチンの分泌を阻害し、また、腸、膵臓腺房細胞、およ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、アルツハイマー病およびパーキンソン病で報告された。バソプレッシンは、腎臓内で水分吸収およ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、および肝臓内でのグリコーゲン分解を刺激する。バソプレッシンおよびその類似体は、尿崩症の治療のため臨床的に用いられる。エンドセリンおよ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などの薬剤は、血圧を下げるのに用いられる (Watson, S. および S. Arkininstall (1994) *The G-protein Linked Receptor Facts Book*, Academic Press, San Diego CA, 194、252、284、55、および111の各ページ)。

【 0 0 1 9 】

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、持続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. および Fleetwood-Walker, S. M. (1998) *Trends Pharmacol. Sci.* 19:346-348)。

【 0 0 2 0 】

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。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、マトリックスメタロプロテイナーゼ類は細胞外マトリックス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、および関節炎において或る重要な役割を果たす (Reponen, P. 他 (1995) *Dev. Dyn.* 202:388-396; Firestein, G. S. (1992) *Curr. Opin. Rheumatol.* 4:348-354; Ray, J. M. および Stetler-Stevenson, W. G. (1994) *Eur. Respir. J.* 7:2062-2072; Mignatti, P. および Rifkin, D. B. (1993) *Physiol. Rev.* 73:161-195)。乳酸脱水素酵素AはcMycによる腫瘍誘発

に関連していると考えられている(Lewis, B.C. 他 (2000) *Cancer Res.* 60:61786183)。別の例は、脂質合成にまた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(Luong, A. 他 (2000) *J. Biol. Chem.* 275:26458-26466)およびセリンプロテアーゼ阻害物質であるマスピンである。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、高血圧との関連が示されている(Toh, H. (1991) *Protein Seq. Data Anal.* 4:111-117 およびIwai, N. 他 (1994) *Hypertension* 23:375-380)。マスピンはプロテアーゼインヒビターのセルピンファミリーに関連しており、癌抑制因子として作用し、腫瘍進行の逆転に関与していることも示されている。マスピンは正常哺乳動物の上皮細胞で同定されたが、哺乳動物の癌細胞株には同定されず、進行癌において発現の喪失が最も著しかった。腫瘍進行のマーカーとしてのマスピンの使用は診断的また予知的マーカーとなる。さらに、薬物的手段によるマスピンの再発現の誘発は乳癌の治療において将来有望な治療を提供し得る(Zou, Z. 他 (1999) *Science* 263:526-529; Maass, N. 他 (2000) *Acta Oncol.* 39:931-934)。

10

【0021】

多くの異性化酵素は、タンパク質の折りたたみ、光伝達、およ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つのファミリーは、FK506結合タンパク質類(FKBP)とシクロフィリン類(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ある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およびFKBP65)は、細胞の様々な領域に局在し、それらの領域で様々なタンパク質複合体と会合する、(Coss, M.他 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:29336-29341; Schreiber, S.L. (1991) *Science* 251:283-287)。

20

【0022】

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およ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構築または分解、およ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 NinaA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、形質転換および分化の調節での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. および Ness, S.A. (1998) *Mol. Cell.* 1:203-211)。

30

40

【0023】

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つまたは2つのコピーがあり、PPXYは、シグナル伝達、細胞周期進行、およ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 S A* 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

50

タンパク質類がある。これらのタンパク質とは、プロトンピン、タンパク質 C、S および Z、並びに血液凝固第 VII 因子、第 IX 因子および第 X 因子である。オステオカルシン (骨-Glaタンパク質、BGP) およびマトリックス Glaタンパク質 (MGP) もまた、Glaを含む (Friedman, P.A. および C.T. Przysiecki (1987) Int. J. Biochem. 19:1-7; C. Vermeer (1990) Biochem. J. 266:625-636)。

【0024】

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、真菌およ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、顆粒球およ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およ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、そのドメインが70~110アミノ酸残基の長さの領域であり、Ig可変領域様 (V) ドメインまたは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およびIIの主要組織適合性 (MHC) タンパク質が、さらに、「分化クラスター」抗原すなわちCD抗原のCD2、CD3、CD4、CD8、ポリIg受容体、Fc受容体、神経細胞接着分子 (NCAM) および血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) など、免疫細胞特異的表面マーカー群が含まれる。

10

20

【0025】

Igドメイン (V および C) は、ポリペプチドに免疫グロブリン (または抗体) 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。免疫グロブリン (または抗体) フォールドはほぼ平行になった2層のシートからなる。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保存的なシステイン残基が形成し、2層のシートを接続する。各シートは、3または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。ストランド内のアミノ酸残基の疎水性および親水性の相互作用がIgフォールドを安定化させる (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。

30

【0026】

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、エキソンおよ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、それぞれVおよび/またはCドメインの数が異なる。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。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およ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また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または欠いている。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、胸腺細胞および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。

40

【0027】

50

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、または異なる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、軽鎖およ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、または発生中およ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ページの概説を参照）。

10

【0028】

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または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細胞およ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およ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に応答する場合に発生する(Alberts, B. 他(1994) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York, NY, 1229-1246ページの概説を参照)。

20

【0029】

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、または、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 およびIgMは、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ のH鎖型によって定義される。L鎖にはk と λ の2つのタイプがあり、どちらもH鎖対を持つペアとして会合している。血液循環内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、または多量体である。

30

【0030】

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または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鎖または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鎖またはL鎖群の中でも異なる。H鎖または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鎖および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

【0031】

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。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

50

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。

【0032】

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

【0033】

発現プロファイリング

アレイ技術は、単一の多型遺伝子の発現や、多数の関連遺伝子または無関係の遺伝子の発現プロフィー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。発現プロフィールを調べると、組織特異的である遺伝子、毒性試験でテストする物質によって影響される遺伝子、シグナル伝達カスケードの一部である遺伝子、管理的な機能を実行する遺伝子、または特定の遺伝的素因、状態、疾患または障害に特異的に関連する遺伝子を同定するためのプラットフォームをアレイは提供する。

20

【0034】

新規の分泌タンパク質およびそれらをコードするポリヌクレオチド群の発見により、新規の組成物群を提供することで、当分野の要望に応えることができる。これら新規の組成物は、細胞増殖異常、自己免疫/炎症疾患、心血管疾患、神経系疾患、および発達障害の、診断・治療・予防において有用であり、また、分泌タンパク質の核酸配列およびアミノ酸配列の発現における外来性化合物群の効果についての算定にも有用である。

【発明の開示】

【発明の効果】

30

【0035】

本発明は、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」、および「SECP-23」と呼ぶ分泌タンパク質である精製されたポリペプチドを提供する。或る実施態様において本発明は、(a) SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一性のある天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択した単離されたポリペプチドを提供する。一実施態様では、SEQ ID NO:1-23のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

40

【0036】

また、本発明は(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23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:1-23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、または(d) SEQ ID NO:1-23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

50

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:1-23からなる群から選択した或るポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:24-46からなる群から選択される。

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23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、および(d) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片からなる群から選択したポリペプチドをコードするようなポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

10

【0037】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドと、(b) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の同一性を有する天然のアミノ酸配列からなるポリペプチドと、(c) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-23とからなる群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片とで構成される群から選択されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、(a) 組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、(b) そのように発現したポリペプチドを回収する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーター配列を有する。

20

【0038】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23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:1-23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、および(d) SEQ ID NO:1-23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

【0039】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド配列、(d) (b) に相補的なポリヌクレオチド配列、および(e) (a) ~ (d) のRNA等価物からなる群から選択された単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも60の連続したヌクレオチドを有する。

40

【0040】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a) SEQ ID NO:24-46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:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c) (a) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(d) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、または(e) (a) ~ (d) のRNA等価物を含む群から選択されたポリヌクレオチドの配列を有する。検出方法は、(a) サンプル中の上記標的ポリヌクレオチドに相補的な或る配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチド群からなる或るプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズ

50

する過程と、(b)該ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出し、複合体が存在すればオプションでその量を検出する過程からなる。該プローブと該標的ポリヌクレオチドあるいはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは、該標的ポリヌクレオチドに対し特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む。

【0041】

本発明はまた、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは、(a)SEQ ID NO:24-46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:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%が同一の天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(c)(a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、および(e)(a)~(d)のRNA等価物からなる群から選択されたポリヌクレオチドの配列を有する。検出方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまた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またはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまた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。

10

【0042】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物を提供する。有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチドの生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群から選択される。一実施例では、その組成物は、SEQ ID NO:1-23からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む。更に、本発明は、機能的SECPの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供し、その内にはそのような治療を必要とする患者にこの組成物を投与することが含まれる。

20

【0043】

本発明はまた、(a)SEQ ID NO:1-23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、(b)SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および(d)SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群から選択されたポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために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)ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的SECPの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供し、その内にはそのような治療を必要とする患者にこの組成物を投与することが含まれる。

30

40

【0044】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO:1-23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:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c)SEQ ID NO:1-23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、および(d)SEQ ID NO:1-23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を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを含むサンプルを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

50

を検出する過程とを含む。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的SECPの過剰な発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供し、その内にはそのような治療を必要とする患者にこの組成物を投与することが含まれる。

【0045】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23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、(b) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一の天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO:1-23を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO:1-23からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片を含む群から選択されたポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物と混合させる過程と、(b) 試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

10

【0046】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO:1-23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:1-23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%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:1-23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、および(d) SEQ ID NO:1-23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

【0047】

更に本発明は、SEQ ID NO:24-46からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変容させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、(a) この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、(b) この標的ポリヌクレオチドの発現の変容を検出する過程と、(c) 化合物の存在下での異なる量の標的ポリヌクレオチドの発現を化合物の不存在下での発現と比較する過程を含む、該スクリーニング方法を提供する。

30

【0048】

本発明は更に、(a) 核酸を含む生物学的サンプルを試験化合物で処理する過程と、(b) (i) SEQ ID NO:24-46を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO:24-46を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(iii) (i) に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv) (ii) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v) (i) ~ (iv) のRNA等価物を含む群から選択したポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドから構成されるプローブを用いて、処理した生物学的サンプルの核酸をハイブリダイズする過程とを含む試験化合物の毒性の算定方法を提供する。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドの間に特定のハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で発生し、上記標的ポリヌクレオチドは、(i) SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO:24-46からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%が同一である天然のポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(iii) (i) のポリヌクレオチドに相補的なポ

40

50

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等価物を含む群から選択する。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と、(c)ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d)処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程を含み、処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量の差は、試験化合物の毒性を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

(本発明の記載について)

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

【0050】

請求の範囲及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のもを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には単数または

10

20

【0051】

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ある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または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明に関係があるであろう細胞株、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。

30

【0052】

(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)から得られる実質的に精製されたSECPのアミノ酸配列を指す。

【0053】

用語「アゴニスト」は、SECPの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。このアゴニストは、SECPに直接相互作用するか、或いはSECPが関与する生物学的経路の成分と作用して、SECPの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

40

【0054】

用語「対立遺伝子変異体/変異配列」は、SECPをコードする遺伝子の別の形を指す。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異から作製し得る。また、変容したmRNAまたはポリペプチドを作製し得る。その構造または機能は、変容することもしないこともある。遺伝子は、天然の対立遺伝子変異体を全く有しないか、1個若しくは数個の天然の対立遺伝子変異体を有し得る。対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は一般に、ヌクレオチドの自然な欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で1回若しくは数回生じ得る。

【0055】

SECPをコードする「変容した/改変された」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、

50

挿入、或いは置換を有し、その結果、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指す。この定義には、SECPをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置での対立遺伝子変異配列との不適當或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにSECPをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多型性を含む。コードされるタンパク質も「変容する/改変される」ことがあり、サイレント変化を生じ機能的に等価なSECPとなる、アミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。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/または両親媒性についての類似性に基づいて成され得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとトレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシンおよびバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

10

【0056】

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

20

【0057】

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

【0058】

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である。アンタゴニストは、SECPに直接相互作用するか、或いはSECPが関与する生物学的経路の成分と作用して、SECPの活性を調節する抗体、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。

【0059】

「抗体」の語は、そのままの免疫グロブリン分子やその断片、例えばFab、F(ab')₂及びFv断片を指し、これらは抗原決定基と結合することができる。SECPポリペプチドと結合する抗体は、免疫抗原として、そのままのポリペプチド、または関心のある小ペプチドを含む断片を用いて作製可能である。動物(マウス、ラット、ウサギ等)を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳、または化学合成によって得られるポリペプチドまたはオリゴペプチドに由来し得るもので、所望によりキャリアタンパク質に抱合することも可能である。通常用いられるキャリアであってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びスカシガイのヘモシアニン(KLH)等がある。結合その結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

30

【0060】

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

40

【0061】

用語「アプタマー」は、特定の分子標的に結合する核酸またはオリゴヌクレオチドを指す。アプタマーは*in vitro*の進化過程(例えば米国特許番号第5,270,163号に記載されたSELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichmentの略、試験管内選択法))から由来するもので、そのような過程は大きな組み合わせライブラリから標的特定の異なるアプタマー配列を選択する。アプタマー組成は、2本鎖または1本鎖であってもよ

50

く、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体、または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーのヌクレオチド構成要素は修飾された糖基(例えば、リボヌクレオチドの2'-OH基が2'-Fまたは2'-NH₂で置換されている)を有することが可能で、これらの糖基は、例えば、ヌクレアーゼに対する耐性あるいは血中でのより長い寿命など、望む性質を改善しうる。循環系からアプタマーが除去される速度を遅くするために、アプタマーを高分子量キャリア等の分子に抱合させることができる。アプタマー類は、例えば或る架橋剤の光活性化によって、それらの同種リガンド群と特異的に架橋させ得る(Brody, E.N. および L. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13等を参照)。

【0062】

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

【0063】

「spiegelmer」の語はL-DNA、L-RNAその他の左旋性ヌクレオチド誘導体またはヌクレオチド様分子を含むアプタマーを指す。左旋性ヌクレオチドを含むアプタマーは、右旋性のヌクレオチドを含む基質に通常作用する天然の酵素による分解に耐性がある。

【0064】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」(コーディング)鎖と塩基対を形成することが可能な任意の組成物を指す。アンチセンス組成物の例には、DNAや、RNAや、ペプチド核酸(PNA)や、修飾されたバックボーン連鎖たとえばホスホロチオ酸、メチルホスホン酸また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'-メトキシエチル糖または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、あるいは修飾された塩基たとえば5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは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、化学合成または転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が形成した天然の核酸配列と塩基対を形成し、転写または翻訳を阻止する二重鎖を形成する。「負」または「マイナス」という表現は、或る参考DNA分子のアンチセンス鎖を指すことがあり、「正」または「プラス」という表現は、或る参考DNA分子のセンス鎖を意味し得る。

【0065】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能または生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然あるいは組換え体のSECP、合成のSECPまたはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物ある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。

【0066】

「相補(的)」または「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'-AGT-3'」は、相補配列「3'-TCA-5'」と対合する。

【0067】

「~のポリヌクレオチド配列を含む(有する)組成物」及び「~のアミノ酸配列を有する組成物」は、所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を含む広範囲の任意の成分を指す。この組成物には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。SECP若しくはSECPの断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このプローブは、凍結乾燥状態で保存可能であり、糖質などの安定化剤と結合させることが可能である。ハイブリダイゼーションにおいては、塩(例えばNaCl)、界面活性剤(例えばドデシル硫酸ナトリウム; SDS)及びその他の構成要素(例えばデンハート液、粉乳、サケの精子のDNA等)を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

【0068】

10

20

30

40

50

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット (Applied Biosystems, Foster City CA) を用いて5'及び/または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、またはGELVIEW断片構築システム (GCG, Madison, WI) か、あるいはPhrap (University of Washington, Seattle WA)等の断片構築用のコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上の重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長及び構築の両方を行ってコンセンサス配列を作製する配列もある。

【0069】

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

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

【0070】

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

【0071】

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

【0072】

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

【0073】

「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、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに共有結合または非共有結合するようなレポーター分子または酵素を指す。

【0074】

「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）、あるいは減少（下方調節）、または欠損遺伝子またはタンパク発現の欠損を指す。このような比較は例えば、治療後サンプルと未治療のサンプルまたは病態のサンプルと正常サンプルの間で行われ得る。

【0075】

「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。1つのエキソンはコードされるタンパク質の1つの構造的または機能的ドメインを代表し得るため、安定したサブストラクチャー群の新たな組み合わせによって、新しいタンパク質が組立てられることが可能であり、新しいタンパク質機能の進化を促進できる。

用語「断片」は、SECPまたは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）と同一であるがその配列より長さが短いものを指す。断片は、定義された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5～1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、或る分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸（またはポリペプチドの最初の25%または50%）から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

【0076】

SEQ ID NO:24-46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:24-46を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO:24-46のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、またはSEQ ID NO:24-46を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。SEQ ID NO:24-46の断片の正確な長さ及び、断片が対応するSEQ ID NO:24-46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。

【0077】

SEQ ID NO:1-23のある断片は、SEQ ID NO:24-46のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-23の断片には、SEQ ID NO:1-23を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、SEQ ID NO:1-23の断片は、SEQ ID NO:1-23を特異認識する抗体を産出するための免疫抗原性ペプチドとして有用である。SEQ ID NO:1-23の断片、及び断片が対応するSEQ ID NO:1-23の領域の正確な長さは、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。

【0078】

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

【0079】

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

【0080】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」または「一致%」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

10

20

30

40

50

間で一致する残基の割合を意味する。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、2つの配列をより有意に比較できる。

【0081】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。このプログラムは、LASERGENE ソフトウェアパッケージ(一組の分子生物学的分析プログラム)(DNASTAR, Madison WI)の一部である。このCLUSTAL Vは、Higgins, D.G. 及び P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列をペアワイズでアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定される。「weighted(重み付けされた)」残基重み付け表が、デフォルトとして選択される。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「percent similarity(類似率)」として一致率を報告する。

10

【0082】

或いは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)が一般的に用いられ、且つ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している(Altschul, S.F. 他(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。このアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列をペアワイズで直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp(以下に記載)の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ及び他のパラメータをデフォルト設定に設定して用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

20

30

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

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

40

【0083】

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

50

を生成し得ることを理解されたい。

【0084】

ポリペプチド配列に用いられる用語「一致率」または「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残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の電荷及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

【0085】

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でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定される。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスが選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

10

【0086】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えば、2つのポリペプチド配列をペアワイズで比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (Apr-21-2000)でblastpを使用しうる。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

20

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

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

30

【0087】

「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。

【0088】

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。

40

【0089】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相補性を共有することの指標である。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容的アニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が

50

減少する。核酸配列のアニールングに対する許容条件は、当業者が慣例的に決定できる。許容条件は、どのハイブリダイゼーション実験でも一定でありうるが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験によって変更することができる。アニール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100 μg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0090】

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

10

【0091】

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

20

【0092】

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(C₀tまたはR₀t解析等)。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、或いは他の適切な基板であって細胞若しくはその核酸が固定される基板)に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

30

【0093】

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

【0094】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患また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。

40

【0095】

用語「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物などの生物に導入すると免疫反応を引き起こす、SECPのポリペプチド断片また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または当分野で周知のあらゆる抗体生産方法に有用なSECPのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

【0096】

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、ポリペプチドまたはそ

50

の他の化合物の構成を指す。

【0097】

用語「エレメント」または「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、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0098】

用語「モジュレート」または「活性の調節」は、SECPの活性の変化を指す。例えば、調節によって、SECPのタンパク質活性の増減、或いは結合特性またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起こる。

【0099】

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

10

【0100】

「機能的に連結した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写また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配列は非常に近接するか、或いは連続的に隣接し得、2つのタンパク質コード領域を接続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る。

20

【0101】

「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、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。末端のリジンは、この組成物に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の伸長を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

【0102】

SECPの「翻訳後修飾」には、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解性切断及び当分野で既知の、その他の修飾が含まれ得る。これらのプロセスは、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、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。

30

【0103】

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

40

【0104】

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

【0105】

50

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

【0106】

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よく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロボースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research(マサチューセッツ州ケンブリッジ)より入手可能)によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ(mispriming library)」を入力できる。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である(後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれの情報源から得てユーザー固有のニーズを満たすように修正し得る)。PrimerGenプログラム(英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能)は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまた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また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。

【0107】

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配列である。この人為的組合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らの文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した、変容した核酸も含む。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することが可能である。

【0108】

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

【0109】

「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。調節因子は、転写、翻訳またはRNA安定性を調節する宿主タンパク質またはウイルスタンパク質と相互作用する。

【0110】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いられる化学的または生化学的部分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。本明細書において、DNA配列に対する「RNA等価物」とは、基準となるDNA配列と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、窒素性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。

10

【0111】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。SECP、SECPをコードする核酸、またはその断片を含むと推定されるサンプルは、体液と、細胞や細胞から単離された染色体や細胞内小器官(オルガネラ)または膜からの抽出物と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリント等を含み得る。

【0112】

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(例えば抗原決定基即ちエピトープ)であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存している。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。

20

【0113】

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

【0114】

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

30

【0115】

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、磁気または非磁気ビーズ、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、壁、溝、ピン、チャンネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基板表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0116】

「転写イメージ(transcript image)」または「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または組織による集合的遺伝子発現のパターンを指す。

40

【0117】

「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、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核宿主細胞また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、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

50

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。

【0118】

ここで用いる「遺伝形質転換体(transgenic organism)」とは任意の生物であり、限定するものではないが動植物を含み、生物の1個以上の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られているトランスジェニック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、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することにより、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の感染によって行う。In one alternative, the nucleic acid can be introduced by infection with a recombinant viral vector, such as a lentiviral vector (Lois, C. et al. (2002) Science 295:868-872). 遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いは試験管内受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合(transconjugation)によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrook他(1989)等の参考文献に記載されている。

10

【0119】

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%またはそれ以上の相同性を示し得る。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」変異体または「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かなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングによって通常、より多くまたはより少数のヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多型性変異体は、所与の種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1塩基多型性」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

20

30

【0120】

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%の相同性を有するポリペプチド配列として定義される。定義付けには、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、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

40

(発明)

本発明は、新規のヒト分泌タンパク質群(SECP)および、SECPをコードするポリヌクレオチド群の発見に基づく。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、神経障害、および発達障害の、診断、治療、および予防の開発に基づく。

【0121】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名の概略である。各ポリヌクレオチド及びその対応するポリペプチドは、1つのIncyteプロジェクト識

50

別番号 (IncyteプロジェクトID) と関連する。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およびポリヌクレオチド配列に相当する物理的な、完全長クローンのIncyte ID 番号を示す。完全長のクローンは列3に示すポリペプチド配列に少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドをコードする。

【0122】

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および列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:) およびそれに対応するIncyteポリペプチド配列番号 (IncyteポリペプチドID) を示す。列3は、GenBankの最も近い相同体の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との間の一致を表す確率スコアを示す。列5は、GenBankと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。これらを引用することを以って本明細書の一部とする。

10

【0123】

表3は、本発明のポリペプチドの様々な構造的特徴を示す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドのポリペプチド配列識別番号 (SEQ ID NO:) およびそれに対応するIncyteポリペプチド配列番号 (IncyteポリペプチドID) を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4および列5はそれぞれ、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム (Genetics Computer Group, Madison WI) によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示す。列6は、シグネチャ配列、ドメイン、およ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 (「シグナルペプチド」および/または「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、該当箇所にはさらに分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。

20

30

【0124】

表2および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はヒト乳酸脱水素酵素A (GenBank ID g12331000) とM1残基からL371残基まで91%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) BLAST確率スコアは $1.2e-180$ 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、乳酸/リンゴ酸脱水素酵素ドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル (HMM) を基にした保存されたタンパク質ファミリドメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された (表3参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO:1が乳酸デヒドロゲナーゼであるという、さらに確証的な証拠を提供する。

40

【0125】

別の例において、SEQ ID NO:8はヒトSlit-1タンパク質 (GenBank ID g4049585) に残基S80からA268まで32%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) によって確認された。 (表2参照) BLAST確率スコアは $1.3e-19$ であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO:8はまた、ロイシンリッチリピート、ロイシンリッチリピートC末端ドメインおよびロイシンリッチリピートN末端ドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル (HMM) を基にした保存されたタンパク質ファミリドメインのPFAMデータベースにおいて、統計的

50

に有意な一致を検索して決定された (表3参照)。BLIMPSおよびMOTIFS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さらに実証する確証的証拠を提供する (Splitタンパク質は他のモチーフと共にロイシンリッチリピートを含む推定分泌タンパク質をコードする)。

【0126】

他の実施例において、SEQ ID NO:9 はヒトbA425Ab.2 (コネキシンに類似) (GenBank ID g10334641) に残基K9から残基V356まで100%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって確認された (表2参照)。BLAST確率スコアは $2.6e-190$ 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:9はまた、1つのコネキシンドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル (HMM) を基にした保存されたタンパク質ファミリドメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された (表3参照) BLIMPS、MOTIFSおよびPROFILESCAN解析からのデータはさらに SEQ ID NO:9 がコネキシン含有タンパク質である、さらに確証的証拠を提供する (「コネキシン」はコネクソンを構成する膜内在性タンパク質の六量体である。コネクソンは小分子が細胞間に拡散するギャップ結合を作る、きっちり詰まった対の膜貫通チャネルである)。

【0127】

さらに、SEQ ID NO:19はシグナルペプチドドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル (HMM) を基にした保存されたタンパク質ファミリドメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された (表3を参照)。BLIMPS解析よりのデータは、SEQ ID NO:19 が分泌タンパク質である、さらに実証的な証拠を提供する。SEQ ID NO:2 - 7、SEQ ID NO:10 - 18、および SEQ ID NO:20 - 23は同じような方法で解析し、注釈を付けた。SEQ ID NO:1 - 23の解析のためのアルゴリズム及びパラメータが表7で記述されている。

【0128】

表4に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列、またはゲノムDNA由来のコード (エキソン) 配列、或いはこれらの2種類の配列のあらゆる組み合わせを用いて組み立てた。列1は本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド配列識別番号 (ポリヌクレオチドSEQ ID NO) および対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号 (Incyte ID)、およ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、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列の構築に使われたcDNA配列および/またはゲノム配列のヌクレオチド開始位置 (5') と停止位置 (3')、およびSEQ ID NO:24-46を同定するか、またはSEQ ID NO:24-46と、関連するポリヌクレオチド配列とを区別する技術 (例えば、ハイブリダイゼーション技術または増幅技術) に有用なポリヌクレオチド配列の断片のヌクレオチド開始位置 (5') と終了位置 (3') を示す。

表4の列2で記述されたポリヌクレオチド断片は、具体的にはたとえば組織特異的なcDNAライブラリまたはプールされたcDNAライブラリに由来するIncyte cDNAを指す場合がある。或いは列2の識別番号は、完全長ポリヌクレオチド配列のアセンブリに寄与するGenBank cDNAまたは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」または「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)。または列で記述されたポリヌクレオチド断片は、「エキソンスティッチング (exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方からなる群を意味する場合がある。例えば、FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄ として同定されるポリヌクレオチド配列はアルゴリズムが適用され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」配列である (実施例5参照)。ま

10

20

30

40

50

たは、列2のポリヌクレオチド断片は「エキソストレッチング(exon-stretching)」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンの集合を指す場合もある。例えば、FLXXXXXX_gAAA AAA_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」配列である。ここでXXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソストレッチング」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号またはNCBI RefSeq 識別番号である。(実施例5を参照。) RefSeq 配列が「エキソストレッチング」アルゴリズムのタンパク質相同体として使われた場合は、RefSeq 識別子(「NM」、「NP」または「NT」と表示された)はGenBank 識別子(すなわち、gBBBBB)の代わりに使われる場合もある。

あるいは、接頭コードは手で編集されたか、ゲノムDNA配列から予測されたか、または配列解析方法の組み合わせから由来している構成配列を識別する。次の表は構成配列の接頭コードと、接頭コードと関連する同じ配列の分析方法の例を列記する(実施例4と5を参照)。

10

【0129】

接頭コード	解析のタイプまたはプログラムの例
GNN GFG ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK)を用いたゲノム配列からのエキソン予測
GBI	手動で編集された、ゲノム配列の解析
FL	スティッチまたはストレッチゲノム配列(実施例5参照)
INCY	ゲノムへのEST配列のマッピングからの完全長転写物とエキソン予測エキソンと転写物を予想するために、ゲノム位置とEST構成データが組み合わせられる。

20

30

【0130】

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

【0131】

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

40

【0132】

本発明はまた、SECPの変異体も含む。好適なSECPの変異体は、SECPアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%、あるいは少なくとも約90%、さらには少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有し、SECPの機能的または構造的特徴を少なくとも1つ含む変異体である。

【0133】

本発明はまた、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:24-46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。SEQ ID NO:24-46のポリヌクレオチド配列には、配列表に示したよ

50

うに等価RNA配列をも含むが、そこでは窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくリボースで構成される。

【0134】

本発明はまた、SECPをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。詳細には、このようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、SECPをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約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有する。本発明の或る実施態様では、SEQ ID NO:24-46からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%もの一致率を有するようなSEQ ID NO:24-46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つ有するアミノ酸配列をコードし得る。

10

【0135】

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配列のスプライス変異体である。スプライス変異体は、SECPをコードするポリヌクレオチド配列と有意な配列同一性をもつ部分であり得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングによって生じるブロックの配列の追加または欠損のため、その変異体は通常、より多くまたはより少数のヌクレオチドを有することになる。スプライス変異体は、SECPをコードするポリヌクレオチド配列とその全長にわたって、約70%以下の、或いは約60%以下の、或いは約50%以下のポリヌクレオチド同一性を有することがありうるが、スプライス変異体の部分は、SECPをコードするポリヌクレオチド配列の部分に、少なくとも約70%の、或いは少なくとも約85%の、或いは100%のポリヌクレオチドの配列同一性を有することになる。

20

【0136】

例えば、SEQ ID NO:44の配列を持つ或るポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:37の配列を持つポリヌクレオチドのスプライス変異体であり、SEQ ID NO:45の配列を持つ或るポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:38の配列を持つポリヌクレオチドのスプライス変異体であり、またSEQ ID NO:46の配列を持つ或るポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:43の配列を持つポリヌクレオチドのスプライス変異体である。上記のスプライス変異配列は何れも、SECPの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードすることができる。

30

【0137】

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。したがって本発明は、可能なコドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。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。

【0138】

SECPをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は一般に、好適に選択されたストリンジェントな条件下で、天然のSECPのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然のコドンを含めるなどの実質的に異なった使い方のコドンを有するSECP或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作るとは有利となり得る。宿主が特定のコドンを利用する頻度に応じて、特定の真核又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択することが可能である。コードされ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別の理由は、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。

40

【0139】

本発明はまた、SECP及びその誘導体をコードするDNA配列またはそれらの断片を完全に

50

合成化学によって作り出すことも含む。作製後にこの合成配列を、当分野で良く知られた試薬を用いて、種々の入手可能な発現ベクター及び細胞系の何れの中にも挿入可能である。更に、合成化学を用いて、SECPまたはその任意の断片をコードする配列の中に突然変異を導入することも可能である。

【0140】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:24-46 及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G.M.及びS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407、Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511等を参照)。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載されている。

10

【0141】

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

20

【0142】

SECPをコードする核酸配列は当分野で周知のPCR法をベースにした種々の方法で、部分的なヌクレオチド配列を利用して伸長し、プロモーターや調節エレメントなどの上流にある配列を検出する。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である(例えば、Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic.* 2:318322を参照。)別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限酵素断片から得る(例えば、Triglia, T. 他 (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:8186。)第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に関与している。(Lagerstrom, M.他 (1991) *PCR Methods Applic* 1:111-119等を参照)。+この方法では、PCRを行う前に複数の制限酵素の消化及びライゲーション反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている(Parker, J.D.他 (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoter Finderライブラリ (Clontech, Palo Alto CA)を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

30

40

50

【0143】

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

【0144】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで活性化される蛍光色素と、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。

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配列また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、その断片または機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号に固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のアミノ酸配列をコードする別のDNA配列が作られ得り、これらの配列をSECPの発現に利用可能である。

【0145】

種々の目的でSECPをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング及び/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的変異誘導を利用して、新規な制限部位の作製、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を起こす突然変異を導入し得る。

【0146】

本発明のヌクレオチドを、MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; 米国特許第5,837,458号; Chang, C.-C. 他 (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他 (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. 他 (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)などのDNAシャッフリング技術を用いてシャッフリングして、SECPの生物学的または酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのSECPの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCRを介する組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。従って、人工的な育種及び急速な分子の進化によって多様な遺伝子が作られる。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を組み換えて、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と組み換え、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指示された制御可能な方法で最大化させることができる。

【0147】

別の実施例によれば、SECPをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である (例えば、Caruthers, M.H. 他 (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser 7:215-223; 及びHorn, T. 他 (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser.225-232

10

20

30

40

50

を参照)。別法として、化学的方法を用いてSECP自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる (Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY, 55-60ページ、Roberge, J.Y.他 (1995) Science 269:202204等を参照)。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて達成し得る。更にSECPのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または他のタンパク質の配列また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または変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

【0148】

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

【0149】

生物学的に活性なSECPを発現させるために、SECPをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入する。この発現ベクターは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含む。これらの要素には、ベクター及びSECPをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このようなエレメントは、強度及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、SECPをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、ATG開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。SECPをコードする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、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳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 (例えば、Scharf, D. 他 (1994) Results Probl. Cell Differ. 201-18-162.を参照)。

【0150】

当業者に周知の方法を用いて、SECPをコードする配列、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 (例えば、Sambrook, J. 他. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4章及び8章, および16-17章; およびAusubel, F.M. 他. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9章、13章および16章を参照)。

【0151】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、SECPをコードする配列の保持及び発現が可能である。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、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌などの微生物や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) で感染させた昆虫細胞系や、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またはタバコモザイクウイルスTMV) または細菌発現ベクター (例えばTiまたはpBR322プラスミド) で形質転換させた植物細胞系、または動物細胞系がある。(前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509、; Engelhard, E.K. ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945、Takamatsu, N. (1987) EMBOJ. 6:307-311、; 『マグローヒル科学技術年鑑』 (The McGraw Hill Yearbo

10

20

30

40

50

ok of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, 191-196ページ、Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J.J. 他(1997) Nat. Genet. 15:345-355等を参照) レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ送達することができる (Di Nicola, M. 他 (1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356、Yu, M. 他 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344、Buller, R.M. 他 (1985) Nature 317(6040):813-815; McGregor, D.P. 他 (1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226、Verma, I.M. 及び N. Somia (1997) Nature 389:239-242等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

10

【0152】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、SECPをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて選択可能である。例えば、SECPをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング、増殖は、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはPSPORT1 プラスミド(Life Technologies)などの多機能の大腸菌ベクターを用いて達成することができる。ベクターのマルチクローニング部位にSECPをコードする配列を連結反応すると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、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう (例えば、Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:55035509を参照)。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または誘導T7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

20

【0153】

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型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、出芽酵母菌 (Saccharomyces cerevisiae) またはピキア酵母 (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への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。(例えば、Ausubel, 1995,前出、Bitter, G.A. 他 (1987) Methods Enzymol.153:516-544、及びScorer, C. A. 他 (1994) Bio/Technology 121 - 181-184.を参照)。

30

【0154】

植物系を使用してSECPを発現することも可能である。SECPをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独あるいは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および19Sプロモーターによって促進される (Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307311)。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを用いてもよい (例えば、Coruzzi, G. 他 (1984) EMBO J. 3 : 1671-1680 ; Broglie, R. 他 (1984) Science 224 : 838-843 ; および Winter, J. 他 (1991) Results Probl. Cell Differ. 17 : 85-105を参照) これらの構成物は、

40

直接DNA形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である。(『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY,191-196ページ等を参照)。
哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後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をコードする配列を連結し得る。アデノウイルスゲノムの非必須のE1またはE3領域へ挿入することにより、宿主細胞内でSECPを発現する感染ウイルスを得ることができる (例えば、Logan, J. および T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:36553659を参照)。更に、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。

50

SV40または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。

【0155】

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

【0156】

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をコードする配列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/また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ることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

10

【0157】

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(例えば、Wigler, M. 他 (1977) *Cell* 11:223-232; 及びLowy, I. 他 (1980) *Cell* 22:817-823を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロンに対する耐性を、patはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える(Wigler, M. 他 (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:35673570; ColbereGarapin, F. 他 (1981) *J. Mol. Biol.* 150:114等を参照。)この他の選択可能な遺伝子、例えば、代謝のための細胞の必要条件を変えるProc. Natl. Acad. Sci. USA 85:80478051参照。)可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質 グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である(Rhodes, C.A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121131等を参照)。

20

30

【0158】

マーカー遺伝子発現の存在/不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、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をコードする配列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。または、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。誘導また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

【0159】

一般に、SECPをコードする核酸配列を含み且つSECPを発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、DNA-DNAハイブリダイゼーション或いはDNA-RNAハイブリダイゼーション、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出、定量、或いはその両方を行うための膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含むタンパク質の生物学的検定法または免疫学的検定法がある。

50

【0160】

特異的ポリクローナル抗体また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これ以外のアッセイは、当分野で公知である(Hampton, R. 他(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, Sect. IV, Coligan, J. E. 他(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY, Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ等を参照)。

【0161】

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

【0162】

SECPをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でのこのタンパク質の発現及び回収に好適な条件下で培養され得る。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。

【0163】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力また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」または「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/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための特異的な細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等)は、American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にするように選択し得る。

【0164】

本発明の別の実施例では、SECPをコードする天然の核酸配列、変更された核酸配列、または組換えの核酸配列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スクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分も、市販されている親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分に

は、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、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 (1995) 10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

10

【0165】

本発明の別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液また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またはSP6プロモーターと機能的に連結したタンパク質コード配列の転写及び翻訳をカップルさせる。翻訳は、例えば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。

【0166】

本発明のSECPまたはその断片を用いて、SECPに特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。少なくとも1つ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。試験化合物の例には、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質 (例えば受容体) または小分子が挙げられる。

20

【0167】

ある実施態様では、このように同定された化合物は、例えばリガンドやその断片などのSECPの天然のリガンド、または天然の基質、構造的または機能的に擬似のパートナーまたは天然の結合パートナーに密接に関連している (Coligan, J.E. 他 (1991) Current Protocols in Immunology 1(2): 5章などを参照)。同様に、化合物は、SECPが結合する天然受容体、あるいは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体のある断片に密接に関連する場合がある。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。ある実施態様では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質あるいは細胞膜上のタンパク質のいずれか一方としてSECPを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエ、または大腸菌からの細胞が含まれる。SECPを発現する細胞またはSECPを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、SECPまたは化合物のいずれかの結合、刺激または阻害を分析する。

30

【0168】

或るアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、蛍光色素、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識によりその結合を検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中のある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。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出及び測定を行うことができる。更にこのアッセイでは、無細胞再構成標本、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実施することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定させる。

40

【0169】

本発明のSECPまたはその断片を用いて、SECPの活性を調整する化合物をスクリーニングすることが可能である。このような化合物には、アゴニスト、アンタゴニスト、部分的アゴニスト、または逆アゴニスト等が含まれる。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。

50

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* また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、また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。

【0170】

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また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産生に有用である（米国特許第5,175,383号及び第5,767,337号等を参照）。例えば129/SvJ細胞株等のマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292）等のマーカー遺伝子で破壊された目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。別法では、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的また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マウス系等から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、可能性のある治療薬や毒性薬剤で検査することができる。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の種類を含む少なくとも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）。

【0171】

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）または遺伝子組み換え動物（マウスまたはラット）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。遺伝子組換え子孫または近交系について研究し、可能性のある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。別の実施態様において、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）。

【0172】

（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、例えば配列およびモチーフの文脈における、化学的および構造的類似性が存在する。さらに、SECPを発現する組織の例としては、脳、心臓および肺組織、前立腺、副腎、直腸および卵巣の腫瘍、消化、生殖および精巣組織、神経組織、心臓血管組織、泌尿器組織、癌性肺組織があり、また表6にも示す。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、およ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の発現または活性を低下させることが望ましい。また、SECPの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、SECPの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0173】

したがって、一実施態様において、SECPの発現または活性の低下に関連した疾患の

10

20

30

40

50

治療または予防のために、患者にSECPまた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、そのような疾患のうち、細胞増殖異常の中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、自己免疫/炎症性疾患には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内 10
分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、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、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、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、慢性関節リウマチ炎、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、血小板減少症、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、心血管疾患の中には、う 20
っ血性心不全、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、僧帽弁輪状石灰化、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、及び心臓移植の合併症、動静脈瘤、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノ 30
ー病、動脈瘤、動脈解離、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術、大動脈冠状動脈バイパス手術が含まれ、神経系疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、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、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多 40
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、硬膜下蓄膿症、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、プリオン病(クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、及びGers 50
tmann-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、小脳網膜血管芽腫(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系性の精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄障害、筋ジストロフィー及びその他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病(気分性、不安性の障害、分裂病性疾患)、季節性障害(SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障 60
害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥレット病と、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核部変性症、及び家族性の前頭側頭性健忘症が含まれ、また発達障害の中には、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、精神薄弱)、スミス マジェニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Sydenham舞蹈病(Sydenham's chorea)及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先 70
天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれる。

【0174】

別の実施態様では、SECPまた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、上記しただけに限られるものではないが疾患を含むSECPの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0175】

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の発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0176】

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の発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、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。

10

【0177】

更なる実施例では、SECPの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、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、およ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を発現する細胞また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。

【0178】

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の発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、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。

20

【0179】

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

【0180】

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。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。一本鎖抗体（例えば、ラクダまたはラマ）は有力な酵素阻害剤であり、またペプチドミメティックの設計および免疫吸着剤やバイオセンサーの開発に利点があるであろう(Muyldermans, S. (2001) J. Biotechnol. 74:277-302)。

30

【0181】

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または任意の断片、または免疫原性の特性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウム等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ニアン、ジニトロフェノール等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。

40

50

【0182】

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、または断片は、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、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましい。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。

【0183】

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等を参照)。

10

【0184】

更に、ヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの「キメラ抗体」作製のために開発した技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる (例えば、Morrison, S.L.他. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:68516 855; Neuberger, M.S.他. (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.他. (1985) Nature 314:452-454を参照)。別法では、当分野で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、ランダムな組合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等を参照)。

20

【0185】

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また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等を参照)。

【0186】

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。あるいは、Fab発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性を持つモノクローナルFab断片を迅速且つ容易に同定することが可能となる (Huse, W.D. 他 (1989) Science 246:1275-1281等を参照)。

30

【0187】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体また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、また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)。

40

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または結合活性を表す。

【0188】

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

50

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 1: 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)。

【0189】

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

【0190】

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、またはその任意の断片や相補配列が、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、また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、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片を、SECPをコードする配列の制御領域、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である(Agrawal, S., ed. (1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totowa NJを参照。)

【0191】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を作製する発現プラスミドの形で、細胞内に送達し得る(Slater, J.E. 他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475 及び Scanlon, K.J. 他 (1995)9(13):1288-1296.等を参照)アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる(Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271、前出のAusubel、Ucker t, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347等を参照)。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ及び当分野で公知のその他のシステムが含まれる(Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J.他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315、Morris, M.C. 他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736.等を参照)。

【0192】

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。遺伝子治療を行うことにより、(i) 遺伝子欠損症(例えばX染色体鎖遺伝(Cavazzana-Calvo, M.他 (2000) *Science* 288:669-672)により特徴付けられる重度の複合型免疫欠損(SCID)-X1の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症に関連する重度の複合型免疫欠損(Blaese, R.M. 他 (1995) *Science* 270:475-480、Bordignon, C.他 (1995) *Science* 270:470-475)、嚢胞性繊維症(Zabner, J.他 (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G.他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666、Crystal, R.G.他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703)、サラセミア(thalassaemia)、家族性高コレステロール血症、第VIII因子若しくは第IX因子欠損に起因する血友病(Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410、Verma, I.M. and Somia, N. (1997) *Nature* 389:239-242)を治療し、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ(例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii) 細胞内の寄生生物(例えばヒト

10

20

30

40

50

免疫不全ウイルス(HIV)(Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poescbla, E.他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399)、B型若しくはC型肝炎ウイルス(HBV、HCV)、Candida albicans及びParacoccidioides brasiliensis等の真菌寄生菌、並びにPlasmodium falciparum及びTrypanosoma cruzi等の原生動物寄生体に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。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。

【0193】

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)リボソームを介した形質移入、(iv)受容体を介した遺伝子導入、及び(v)DNAトランスポソンの使用(Morgan, R.A. および W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. および H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)がある。

【0194】

SECPの発現に影響を及ぼし得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)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (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、または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)、または(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。

【0195】

市販のリボ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、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法(Graham, F.L. 及び A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467)若しくは電気穿孔法(Neumann, B. 他 (1982) EMBO J. 1:841-845)を用いて形質転換を行う。初代培養細胞にDNAを導入するためには、標準化された哺乳動物の形質移入プロトコルの修飾が必要である。

【0196】

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. U.S.A. 92:6733-6737)に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞株(VPCL)において増殖され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する親和性を有するエンベロー

10

20

30

40

50

ブ遺伝子またはVSVg等の汎親和性エンベロープタンパク質を発現する (Armentano, D. 他 (1987) J. Virol. 61:1647-1650、Bender, M.A. 他 (1987) J. Virol. 61:1639-1646、Adam, M.A. および 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系を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、細胞集団 (例えばCD4⁺T細胞)の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. 他 (1997) J. Virol. 71:7020-7029、Bauer, G. 他 (1997) Blood 89:2259-2267、Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716、Ranga, U. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206、Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0197】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、SECPの発現に関連する1つ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の作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を脾臓の無損傷の脾島内に導入するためにも用途が広いことが証明された (Csete, M.E. 他 (1995) Transplantation 27:263-268)。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については、Antinozzi, P.A. 他 (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544 及び Verma, I.M. 及び N. Somia (1997) Nature 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0198】

別法では、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つ或いは複数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親和性の中枢神経細胞に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の作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス (HSV) I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に送達するために用いられてきた (Liu, X. 他 (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号 (「Herpes simplex virus swains for gene transfer」)に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモータ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についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22を欠失した組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクターについては、Goins, W.F. 他 (1999) J. Virol. 73:519-532 及び Xu, H. 他 (1994) Dev. Biol. 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なったセグメント群を含む多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、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

【0199】

別法では、ウイルス (正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いて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はSFVゲノムに基づいている (Garoff, H. 及び K.-J. Li (1998) Cun. Opin. Biotech. 9:464-469)。ウイルスRNAの複製中に、ウイルスのカプシドタンパク質

群を通常コードする、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およびポリメラーゼ）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クローンの処置方法、ウイルスのcDNAおよびRNAの形質移入方法およびウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

10

20

30

40

50

【0200】

転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。転写開始部位(transcription initiation site)とは例えばスタート部位(start site)から数えて約 - 10 と約 + 10 の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん体塩基対形成は、二重らせん体が開いてポリメラーゼ、転写因子または調節分子と結合するのを阻害するので有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある（Gee, J.E. 他（1994）in: Huber, B.E.及びB.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, 163-177頁等を参照）。相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するべく設計することができる。

【0201】

リボザイムは酵素的RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、その後起こる内ヌクレオチド鎖切断に参与している。例えば、人工的に作製されたハンマーヘッド型リボザイム分子が、SECPをコードする配列の内ヌクレオチド鎖分解性の切断を特異的且つ効果的に触媒できる可能性がある。

【0202】

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

【0203】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。作製方法には、固相フォスフォアミダイト化学合成等の、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、RNA分子は、SECPをコードするDNA配列の*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。あるいは、相補的RNAを構成的あるいは誘導的に合成するこれらのcDNA作製物を、細胞株、細胞または組織内に導入することができる。

【0204】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにRNA分子を修飾することができる。限

定するものではないが可能な修飾としては、分子の5'末端、3'末端、ある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または2' O-メチルを使用することが含まれる。この概念は、PNAの産出に固有のものであるが、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内因性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されない、アデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル -、メチル -、チオ - 及び同様の修飾をしたものの他、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン (queosine)、ワイプトシン (wybutosine) 等を含める。

【0205】

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な化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を改変し得る。従って、SECPの発現また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の発現また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。

【0206】

特異ポリヌクレオチドの発現を改変する際の有効性に対して、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変容させる場合と、既存の、商用のまたは専用の、天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/また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、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。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。サンプルには例えば、無傷細胞、透過処理した細胞、あるいは *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し、それによって1つ若しくは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を改変する際に試験化合物が有効であることを示す。特異ポリヌクレオチドの発現改変に有効な化合物に対して、例えば分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他 (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他 (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E 15) またはHeLa細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. 他 (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性を調べるためのオリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリをスクリーニングすることに関与している (Bruce, T.W. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruce, T.W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

【0207】

ベクターを細胞また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

10

20

30

40

50

できる。トランスフェクション、リポソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる送達は、当分野でよく知られている方法を用いて実行することができる (Goldman, C.K. 他 (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466.等を参照)。

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

【0208】

本発明のさらなる実施例は、薬物として許容できる或る賦形剤と共に製剤される或る活性成分を一般に有する組成物の投与に関連する。賦形剤には例えば、糖、でんぷん、セルロース、ゴムおよ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、またはSECPのインヒビターなどからなる。

10

【0209】

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

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

20

【0210】

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。

【0211】

SECPまた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含むリポソーム製剤は、その高分子の細胞融合と細胞内送達とを促進し得る。別法では、SECPまたはその断片を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は、マウスモデル系で、脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている (Schwarze, S.R. 他 (1999) Science 285:1569-1572)。

30

【0212】

任意の化合物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において、先ず治療有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲およ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および投与経路を決定することができる。

40

【0213】

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またはその断片、SECPの抗体、SECPのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなど) 量を意味する。治療有効性及び毒性は、細胞培養または動物実験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) またはLD₅₀ (集団の50%の致死量) を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比が治療指数であり、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好ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を策定するのに用いられる。このような組成物に含まれる投与量は、毒性を殆どあるいは全く持たず、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投

50

与形態、患者の感受性および投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

【0214】

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

【0215】

通常、投与量は、投与の経路にもよるが約0.1~100,000 µgであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及び送達方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、ヌクレオチドの処方では、タンパク質また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、ポリヌクレオチドまた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。

【0216】

(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、またはSECPやSECPのアゴニストまたはアンタゴニスト、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調合される。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。この抗体は修飾されたものも、されていないものも可能であり、レポーター分子との共有結合また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。

【0217】

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または細胞と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。

【0218】

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診断のために用いることもできる。用いることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。こ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。

【0219】

一実施形態では、SECPまたは近縁の分子をコードする遺伝子配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、SECPをコードする核酸配列を同定することが可能である。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

10

20

30

40

50

を同定するかどうかが決まるであろう。

【0220】

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あるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:24-46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。

【0221】

SECPをコードするDNAに対して特異的なハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、SECP及びSECP誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をmRNAプローブの作製のためのベクターにクローニングする方法がある。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、in vitroでRNAプローブを合成するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーターの集団によって標識され得る。レポーター集団の例としては、³²Pまたは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。

【0222】

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、そのような疾患のうち、細胞増殖異常の中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、自己免疫/炎症性疾患には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、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、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、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、慢性関節リウマチ炎、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、血小板減少症、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、心血管疾患の中には、うっ血性心不全、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、僧帽弁輪状石灰化、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、及び心臓移植の合併症、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、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術、血管置換術、大動脈冠状動脈バイパス手術が含まれ、神経系疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、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、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、硬膜下蓄膿症、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、プリオン病(クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、及びGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系

10

20

30

40

50

性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系性の精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄障害、筋ジストロフィー及びその他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病 (気分性、不安性の障害、分裂病性疾患)、季節性障害 (SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥレット病と、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核部変性症、及び家族性の前頭側頭性健忘症が含まれ、また発達障害の中には、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、精神薄弱)、スミス マジェニス症候群 (Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Syndenham舞踏病 (Syndenham's chorea) 及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれる。変異SECPの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して、SECPをコードするポリヌクレオチド配列を、サザン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法と、ディップスティック (dipstick)、ピン (pin)、およびマルチフォーマットのELISA様アッセイ、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または定量方法は、当分野で公知である。

10

20

30

40

50

【0223】

或る実施態様では、SECPをコードするヌクレオチド配列は、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて有用であろう。SECPをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。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。患者のサンプルのシグナルの量が、対照サンプルと比べて著しく変わっている場合は、サンプル内のSECPをコードするヌクレオチド配列の変異レベルにより、関連する疾患の存在が明らかになる。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、ある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。

【0224】

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験者から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを定期的に繰り返し得る。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

【0225】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物 (過少発現または過剰発現) の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供し得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法また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または更なる進行を防止すること

が可能となる。

【0226】

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、あるいは*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。

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

10

20

【0227】

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

30

40

【0228】

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またはビオチン標識、対照核酸の共増幅(coamplification)、および、標準曲線から得た結果の補間もある(例えば、Melby, P.C. 他 (1993) J. Immunol. Methods 159:235-244; Duplaa, C. 他 (1993) Anal. Biochem. 212:229-236を参照)。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

50

【0229】

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

10

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-タンパク質相互作用、薬物-標的相互作用および遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定することが可能である。

【0230】

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

20

【0231】

転写イメージは、組織、株化細胞、生検またはその生物学的サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。転写イメージはしたがって、組織また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。

30

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、工業的または天然の環境化合物の毒性試験のみならず、*in vitro*モデル系及び薬剤の前臨床評価と併せて使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを示す、しばしば分子フィンガープリントまたは毒性シグネチャ(toxicant signatures)と称される特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する(Nuwaysir, E.F. 他 (1999) Mol. Carcinog. 24:15 3-159、Steiner, S. 及び N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、該文献は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。試験化合物が、既知毒性を有する化合物のシグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。フィンガープリントまたはシグネチャは、多数の遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合には、最も有用且つ正確である。理想的には、ゲノム全域にわたる発現の測定が最高品質のシグネチャを提供する。たとえ、発現が任意の試験された化合物によって変容しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データをノーマライズすることに使用できるため、それらの遺伝子は重要である。ノーマライズ手順は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャの要素に遺伝子機能を割り当てることが毒性メカニズムの解釈に役立つが、毒性の予測につながる、シグネチャ群の統計的マッチングには、遺伝子機能の知識は必要とされない(例えば2000年2月29日に米国国立環境健康科学研究所(National Institute of Environmental Health Sciences)より発行されたPress Release 00-02を参照されたい

40

50

。これについては<http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>で入手可能である)。従って、毒性シグネチャを用いる中毒学的スクリーニングの際に、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要且つ望ましいことである。

【0232】

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

10

【0233】

別の実施態様は、本発明のポリペプチド配列群を用いて或る組織または細胞タイプのプロテオームを分析することに関する。プロテオームの語は、特定の組織また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、個々に更なる分析の対象とすることができる。プロテオーム発現パターンすなわちプロファイルは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数および相対存在量を定量することにより分析し得る。したがって、或る細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離および分析することにより作成し得る。或る実施例では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により、分離が達成される(前出のSteiner および Anderson)。タンパク質は、通常はクーマシーブルー、あるいは銀染色液また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、例えば試験化合物または治療薬で処理された、または未処理の生物学的サンプルから得られる、同等に位置するタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的にまたは酵素的に切断した後質量分析を行う、標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。或るスポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列データが得られる。

20

30

【0234】

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。或る実施例では、マイクロアレイ上でエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイ要素へのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する(Lueking, A. 他 (1999) Anal. Biochem. 270:103-111, Mendozze, L.G. 他 (1999) Biotechniques 27:778-788)。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオールまたはアミノ反応性蛍光化合物とサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイのエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

40

【0235】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性シグネチャと並行して分析するべきである。数種の組織の数種のタンパク質に対しては、転写物とタンパク質の存在量の相関が乏しいこともあるので(Anderson, N.L. 及び J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537)、転写イメージには有意に影響しないがプロテオームのプロファイルを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。更に、体液中の転写物の分析はmRNAの急速な分解のために困難なので、プロテオームのプロファイル作成はこのような場合により信頼し得、情報価値があり得る。

50

【0236】

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

【0237】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。生体サンプルから得たタンパク質は、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いてインキュベートする。抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生物学的サンプル中のタンパク質の量を、未処理生物学的サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質の量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を標示する。 10

【0238】

マイクロアレイは、本技術分野で既知の方法を用いて調製し、使用し、そして分析する (Brennan, T.M. 他 (1995) の米国特許第5,474,796号、Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler 他 (1995) PCT出願第W095/251116号、Shalon, D. 他 (1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. 他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号等を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, 編集. (1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。該文献は、特に引用することを以って本明細書の一部となす。 20

【0239】

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。コード配列また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、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (例えば、Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134; and Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149--154を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝または制限酵素断片長多型 (RFLP) と関連するような遺伝子連鎖地図を作製できる。 (例えば、Lander, E.S. 及び D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。 30

【0240】

蛍光 *in situ* ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る (前出のHeinz-Ulrich, 他 (1995) in Meyers, 965-968頁等を参照)。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的な染色体地図上のSECPをコードする遺伝子の位置と、特定の疾患また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、位置を決定するクローニングの作業を促進し得る。 40

【0241】

確定した染色体マーカーを用いた連鎖分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳類の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知 50

でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。この情報は、位置クローニング、またはその他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探す研究者にとって価値がある。疾患または症候群に關与する遺伝子が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域にマップされる任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子あるいは調節遺伝子を提示している可能性がある（Gatti, R.A.他（1988）Nature 336:577-580等を参照）。転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0242】

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また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。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することができる。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。

【0243】

別の薬剤スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる（Geysen, 他（1984）PCT application W084/03564等を参照）。この方法においては、多数の様々な低分子の試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、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物に固定することもできる。

【0244】

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。

【0245】

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。

【0246】

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。

【0247】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物は、米国特許出願第60/280.531号、第60/280.596、第60/276.873、第60/273.946号、第60/332.426号、第60/334.229号及び第60/347.703号を含め、言及することをもって特に本明細書の一部となす。

【実施例】

【0248】

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNA群の由来は、LIFESEQ GOLDデータベース（Incyte Genomics, Palo Alto CA）に記載されたcDNAライブラリ群である。幾つかの組織はホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解し、他の組織はホモジナイズしてフェノールまたは変性剤の好適な混合液に溶解した。混合液の1例であるTRIZOL（Life Technologies）は、フェノールとグアニジニウムイソチオシアネートとの単相溶液である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムのクッション液の上に重層して遠心分離するかクロロホルムで抽出し

10

20

30

40

50

た。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0249】

RNAの純度を高めるため、RNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNA分解酵素でRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子 (Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子 (QIAGEN, Chatsworth CA) または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。

【0250】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERSCRIPトプラスミドシステム (Life Technologies) を用いて本技術分野で既知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した (前出の Ausubel, 1997, 5.1-6.6ユニットなどを参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズの選択 (300 ~ 1000 bp) は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech)、或いは分取用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは好適なプラスミドのポリリンカーの適合する制限酵素部位に結合させた。好適なプラスミドは例えば、PBLUESCRIPT プラスミド (Stratagene)、PSPORT1 プラスミド (Life Technologies)、PCDNA2.1 プラスミド (Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMV プラスミド (Stratagene)、PCR2-TOPOTA プラスミド (Invitrogen)、PCMV-ICIS プラスミド (Stratagene)、pIGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、pRARE (Incyte Genomics) または pINCY (Incyte Genomics)、あるいはその誘導体である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含む大腸菌細胞に形質転換した。

【0251】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いた *in vivo* 切除によって、或いは細胞溶解によって、実施例1のようにして得たプラスミドを宿主細胞から回収した。プラスミドの精製には、下記の少なくとも1つを用いた。すなわちMagicまたは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およびQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミド精製キットのいずれかである。プラスミドは、沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥せずに4℃で保管した。

【0252】

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

【0253】

3 シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したIncyte cDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) または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) また

10

20

30

40

50

はMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシーケンシング反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬、または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のシーケンシング反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics) か、標準ABIプロトコル及び塩基呼び出し (base calling) ソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シーケンシングシステム (Applied Biosystems) か、或いはその他の本技術分野で既知の配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法 (前出のAusubel, 1997, 7.7ユニットに概説) を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例 8 に記載した方法で配列を伸長させた。

【0254】

Incyte cDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ(A)配列を除去し、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、IncyteのcDNA配列、またはその翻訳を公共のデータベース (例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM) と、ヒト、ラット、マウス、線虫、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、および驚口瘡カンジダ (*Candida albicans*) からの配列を含むPROTEOMEデータベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA)、及びPFAM等隠れマルコフモデル (HMM) に基づいたタンパク質ファミリーデータベース、INCYおよびTIGRFAM (Haft, D.H. 他 (2001) *Nucleic Acids Res.* 29:41-43)、並びに、SMART (Schultz 他 (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857-5864; Letunic, I. 他 (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:242-244) のようなHMMに基づいたタンパク質ドメインデータベースから選択したデータベースに対して問い合わせた。(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。Eddy, S.R. (1996) *Cuff. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365等を参照。) 問合せは、BLAST、FASTA、BLI MPS及びHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するように構築した。或いは、GenBank cDNA、GenBank EST、ステッチされた配列、ストレッチされた配列またはGenscan予測コード配列 (実施例 4 及び 5 を参照) を用いてIncyte cDNAの集団を完全長まで伸長させた。Phred、Phrap及びConsedに基づくプログラムを用いて構築し、GenMark、BLAST及びFASTAに基づくプログラムを用いてcDNAの集団をオープンリーディングフレームに対してスクリーニングした。対応する完全長ポリペプチド配列を誘導するべく完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳した。或いは、本発明のポリペプチドは完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。引き続き、GenBankタンパク質データベース (genpept)、SwissProt、PROTEOMEデータベース、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びProsites等のデータベース、PFAM等の隠れマルコフモデル (HMM) に基づいたタンパク質ファミリーデータベース、INCY並びにTIGRFAM、およびSMARTのようなHMMに基づいたタンパク質ドメインデータベースに対する問合せによって完全長ポリペプチド配列を分析した。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア (日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA) 及びLASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて分析した。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アラインメントは、アラインメントした配列間の一致率も計算するMEGALIGNマルチシーケンシングアラインメントプログラム (DNASTAR) に組み込まれているようなCLUSTALアルゴリズムによって指定されるデフォルトパラメータを用いて作製する。

【0255】

Incyte cDNA及び完全長配列の分析及びアセンブリに利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略と、適用可能な説明、参照文献、閾値パラメータを表7に示す。用いたツール、プログラムおよびアルゴリズムを表7の列1に、それらの簡単な説明を列2に

示す。列3は好適な参照文献であり、全ての文献は引用を以って全文を本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は、2つの配列が一致する強さを評価するために用いた、スコア、確率値その他のパラメータを示す（スコアが高いほど、または確率値が低いほど、2配列間の同一性が高い）。

【0256】

完全長ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の組み立て及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:24-46のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20～約4000ヌクレオチドの断片を表2の列4に示した。

【0257】

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、様々な生物からのゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. および S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94 及びBurge, C. 及び S. Karlin (1998) Cuf. Opin. Struct. Biol. 8:346-354参照）。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから停止コドンに及ぶ構築されたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30kbに設定した。これらのGenscan予測cDNA配列の内、どの配列が輸送体及びイオンチャネルをコードするかを決定するために、コードされるポリペプチドをPFAMモデルにおいて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。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公共データベースgenpept及びgbpriと比較した。必要であれば、genpeptからのトップのBLASTヒットと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは取り除かれたエキソンなどのGenscanにより予測された配列のエラーを修正する。BLAST分析はまた、任意のIncyte cDNAまたはGenscan予測配列の公共cDNA適用範囲の発見に用いられるため、転写の証拠を提供する。Incyte cDNA適用範囲が利用できる場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を修正または確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に記載された構築プロセスを用いて、Incyte cDNA配列及び/または公共のcDNA配列でGenscan予測コード配列を構築することにより得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は編集または非編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

【0258】

5 cDNA配列データを使ったゲノム配列データの構築

ステッチ配列 (Stitched Sequence)

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

10

20

30

40

50

enscanにより予測された不正確なエキソンは、genpeptからのトップのBLASTヒットと比較することにより修正した。必要な場合には、追加cDNA配列を用いるかゲノムDNAの検査により配列を更に伸長させた。

【0259】

ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

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

10

【0260】

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:24-46を構築するために用いた配列を、BLAST及び他のSmith-Watermanアルゴリズムの実装を用いて、Incyte LIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:24-46 と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrapなどの構築アルゴリズム (表7) を使用して、連続及びオーバーラップした配列のクラスターに組み入れた (表7)。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスタ化された配列が既にマッピングされていたかを確認した。マッピングされた配列が或るクラスターに含まれている場合、そのクラスターの全配列が、個々の配列番号と共に、地図上の位置に割り当てられた。

20

【0261】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または区間として表される。センチモルガン単位での或る区間の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に関して測定する (センチモルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1 cMは、ヒト中のDNAの1メガベース (Mb) にほぼ等しい。もっとも、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットによって広範囲に変化する)。cM距離は、配列が各クラスターに含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対する境界となるようなGenethonによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。NCBI「GeneMap'99」 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>) などの公的に入手可能なヒト遺伝子マップおよびその他の情報源を用いて、既に同定された疾患遺伝子類が、上記の区間内若しくは近傍にマップされているかを決定できる。

30

【0262】

この方法で、SEQ ID NO:37は、134.90~141.40センチモルガンの間隔内で5番染色体にマッピングされた。

40

【0263】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

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

【0264】

BLASTを適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Genomi

50

cs)等のcDNAデータベースにおいて同一また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、特定の一致を厳密な一致、或いは類似的な一致として分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

【0265】

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

$5 \times (\text{長さ(配列1)}, \text{長さ(配列2)})$ の最小値

積スコアは、2つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両方を考慮している。積スコアは、0～100のノーマライズされた値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアリングセグメント対(HSP)に一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不一致塩基対に-4を割り当てることにより、BLASTスコアを計算する。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る(ギャップにより隔離され得る)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアのセグメント対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、断片的オーバーラップとBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えば積スコア100は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致する場合のみ得られる。積スコア70は、一端が100%一致し、70%オーバーラップしているか、他端が88%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。積スコア50は、一端が100%一致し、50%オーバーラップしているか、他端が79%一致し、100%オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。

【0266】

或いは、SECPをコードするポリヌクレオチド配列は、由来する組織に対して分析する。例えば或る完全長配列は、Incyte cDNA配列(実施例3を参照)と少なくとも一部はオーバーラップするように構築される。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、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、胎芽構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液および免疫系、肝、筋骨格系、神経系、膵臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性/混合性または尿路である。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、細胞系、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の組織特異的および疾患特異的な発現を反映する。cDNA配列および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。

【0267】

8 SECPをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、該断片から設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて完全長分子の適切な断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーは、長さが約22～30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上となり、約68～72の温度で標的配列にアニーリングするように、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て、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

【0268】

配列を伸長するために、選択されたヒトcDNAライブラリを用いた。2段階以上の伸長が必要また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

10

20

30

40

50

設計した。

【0269】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research, Inc.) を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマーを有する。また、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と2-メルカプトエタノールを含むバッファー、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE酵素 (Life Technologies)、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene)を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94 , 3分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 60 , 1 分、ステップ 4: 68 , 2 分、ステップ 5: ステップ2、3および 4を20回反復する。ステップ6 : 68 , 5 分、ステップ7: 4 で保存する。別法では、プライマーの組、T7とSK+に対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1: 94 , 3分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 57 , 1 分、ステップ 4: 68 , 2 分、ステップ 5: ステップ2、3および 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。

【0270】

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

【0271】

伸長したヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI)を用いて消化し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech)への再連結反応前に音波処理またはせん断した。ショットガン・シーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度 (0.6 ~ 0.8%)のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化した。伸長したクローンをT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA)を用いてpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene)で処理して制限部位のオーバーハング部分を満たし、大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37 で一晩培養した。

【0272】

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

【0273】

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

【0274】

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

一塩基多型 (SNP) として知られる一般的なDNA配列変異体がLIFESEQ データベース (Illumina Genomics) を用いてSEQ ID NO:24-46において同定された。実施例 3 に記述されているように、同じ遺伝子からの配列を共にクラスターにして構築し、これによって遺伝子内のすべての配列変異体の同定ができた。一連のフィルタからなるアルゴリズムを使って、SNPを他の配列変異体から区別した。前段フィルターは、最小限のPhredクオリティスコア15を要求することにより大多数のベースコールのエラーを除去し、また、配列アラインメントエラーや、ベクター配列、キメラおよびスプライス変異体の不適当なトリミングにより生じるエラーを取り除いた。染色体の高度解析の自動化手順により、推定SNPの近傍におけるオリジナルのクロマトグラムファイルが解析された。クローンエラーフィルタは統計的に生み出されたアルゴリズムを用いて、逆転写酵素、ポリメラーゼ、また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、近縁の相同体または偽遺伝子のクラスター化に起因するエラー、また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、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に存在する重複 (duplicates) とSNPが除去された。

10

【0275】

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

20

【0276】

10 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用

SEQ ID NO:24-46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、またはゲノムDNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 等の最新技術のソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、[$^{-32}$ P]アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250 μ Ciと、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) を混合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストラン ビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba IまたはPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化したヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

30

40

【0277】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは、40°Cで16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば0.1Mクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィまた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。

【0278】

50

1.1 マイクロアレイ

マイクロアレイ上でアレイエレメントの結合または合成は、フォトリソグラフィ、圧電印刷（インクジェット印刷、前出のBalteschweiler等を参照）、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一且つ、無孔の表面を持つ固体とするべきである（Schena（1999）前出）。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。或いは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似の手順を利用して、熱的、紫外線的、化学的または機械的結合手順を用いて基板の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、当業者に周知の利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る（例えばSchena, M. 他（1995）*Science* 270:467-470、Shalon, D. 他（1996）*Genome Res.* 6:639-645、Marshall, A. および J. Hodgson（1998）*Nat. Biotechnol.* 16:27-31を参照）。

【0279】

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

【0280】

組織または細胞サンプルの調製

グアニジニウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)⁺RNAを精製する。各ポリ(A)⁺RNAサンプルは、MLLV逆転写酵素、0.05 pg/μlのオリゴ(dT)プライマー（21mer）、1X 第1鎖バッファ、0.03 unit/μlのRNアーゼ阻害剤、500 μMのdATP、500 μMのdGTP、500 μMのdTTP、40 μMのdCTP、40 μMのdCTP-Cy3（BDS）またはdCTP-Cy5（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット（Incyte）を用い、200 ngのポリ(A)⁺RNAを含有する体積25 ml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 °Cで2時間インキュベートした後、各反応サンプル（1つはCy3、もう1つはCy5標識）は、2.5 mlの0.5 M水酸化ナトリウムで処理し、85 °Cで20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピナラム（CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA)を用いて精製する。混合した後、2つの反応サンプルは、1 mlのグリコーゲン（1 mg/ml）、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100 %エタノールを用いてエタノール沈殿させる。サンプルは次に、SpeedVAC（Savant Instruments Inc., Holbrook NY）を用いて完全に乾燥させ、14 μlの5 × SSC / 0.2 % SDS中で再懸濁する。

【0281】

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

を用いて精製される。

【0282】

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

【0283】

米国特許第 5,807,522 号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。この特許は引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が 100 ng/μl のアレイエレメント DNA 1 μl を高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント (open capillary printing element) に充填する。装置はここで、スライド毎に約 5 nl のアレイエレメントサンプルを加える。

10

【0284】

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

20

【0285】

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 μl のサンプル混合体には、Cy3 または Cy5 で標識した cDNA 合成産物群の各 0.2 μg を、5 × 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で等分して 1.8 cm² のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバーのコーナーに 140 μl の 5 × SSC を加えることにより、チェンバー内部を湿度 100% に保持する。アレイを含むチェンバーは、60 °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 × 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 × SSC) において各々 45 °C で 10 分間 3 度洗浄して乾燥させる。

30

【0286】

検出

レポーター標識されたハイブリダイゼーション複合体は、Cy3 の励起のためには 488 nm、Cy5 の励起のためには 632 nm でスペクトル線を発生し得る Innova 70 混合ガス 10 W レーザ (Coherent, Santa Clara CA) を備えた顕微鏡で検出する。20 × 顕微鏡対物レンズ (Nikon, Inc., Melville NY) を用いて、アレイ上に励起レーザー光の焦点を当てる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御の X-Y ステージに置き、対物レンズを通過してラスタースキャンする。本実施例で用いる 1.8 cm × 1.8 cm のアレイは、20 μm の解像度でスキャンする。

40

【0287】

2 回の異なるスキャンで、混合ガスマルチラインレーザーは 2 つのフルオロフォアを連続的に励起する。発光された光は、波長に基づき分離され、2 つのフルオロフォアに対応する 2 つの光電子増倍管検出器 (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) に送られる。アレイと光電子増倍管間に設置された好適なフィルターを用いて、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。

50

【0288】

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

【0289】

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

【0290】

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

【0291】

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、または阻害するために用いられる。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いる。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)及び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ディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがSECPをコードする転写物に結合するのを阻害する。

13 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には、lacオペレーター調節因子と併用するT5または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)等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、昆虫細胞株また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いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda(Sf9)昆虫細胞への感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられる。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺

10

20

30

40

50

伝的変更が必要になる。(Engelhard, E. K.他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3224-3227, Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照)。

【0292】

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)、または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、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする(Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でSECPからタンパク質的に切断できる。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いた免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂(QIAGEN)上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のAusubel(1995)10章、16章に記載されている。これらの方法で精製したSECPを直接用いて以下の実施例17、18、および19のアッセイを行うことができる。

10

【0293】

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には、pCMV SPORTプラスミド(Life Technologies)及びpCR 3.1プラスミド(Invitrogen, Carlsbad CA)が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5~10µgの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来また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1~2µgのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、CD64または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またはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、ヨウ化プロビジウムによる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。

20

30

【0294】

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または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または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(IgG)の保存領域と結合する。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。

40

【0295】

15 SECPに特異的な抗体の作製

50

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE ; 例えば、Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 182 : 488-495を参照) または他の精製技術で実質的に精製されたSECPを用いて、標準的なプロトコールで動物 (例えば、ウサギやマウス等) を免疫化して抗体を作り出す。

【0296】

或いは、レーザ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, 1995, 11章等を参照)。

10

【0297】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、Fmocケミストリを用いるABI 431A ペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫原性を高める (前出のAusubel, 1995 等を参照)。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド-KLH複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗SECP活性を検査するには、ペプチドまたは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。

20

【0298】

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 Pharmacia Biotech) のような活性化クロマトグラフィー用樹脂と抗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レジンをブロックし、洗浄する。

【0299】

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また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。

30

【0300】

17 SECPと相互作用する分子の同定

SECPまたは生物学的に活性なその断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬で標識する (例えば Bolton A.E.およびW.M. Hunter (1973) *Biochem. J.* 133:529-539を参照)。マルチウェルプレートに予め配列しておいた候補の分子を、標識した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。

40

【0301】

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。SECPはまた、高処理型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス (CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、遺伝子の2つの大きなライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定することができる (Nandabalan, K. 他 (2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0302】

18 SECP活性の実証

50

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. および 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、様々な量のSECPが、放射性DNA前駆物質である $[^3\text{H}]$ 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。酸沈殿し得るDNAへの $[^3\text{H}]$ チミジンの組み込みが、適切な時間間隔で測定され、組み込まれた量は新規に合成されたDNAの量に直接比例する。少なくとも100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1単位の活性は、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、酸沈殿し得るDNAへの $[^3\text{H}]$ チミジンの最大の組み込みを表す。

10

【0303】

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の神経調節効果を示す(Morimoto, T.他(1995) Neuron 15:689-696)。

【0304】

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、小さい膜で囲まれた小胞、およびその他の分泌細胞小器官のような、細胞内区画の単離を可能とする。分画した細胞ライセートおよび全体の細胞ライセートよりの免疫沈降は、SECP特異抗体を用いて実行され、また免疫沈降サンプルは、SDS-PAGEおよび免疫ブロット技術を用いて解析される。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。

20

【0305】

別法では、AMP結合活性の測定を、SECPと ^{32}P 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。

30

【0306】

SECPの微小管運動性アッセイによって運動タンパク質活性を測定できる。このアッセイにおいて、組換えSECPをガラスのスライドまたは同様の基板に固定する。ATPおよび細胞質抽出物を含む溶液に入れた、タキソールで安定化されたウシ脳の微小管(市販されている)をスライド面に漑流する。SECP運動活性によって駆動される微小管の運動はビデオ光学顕微鏡および画像解析技術を用いて視覚化でき、定量化できる。SECPの活性は微小管運動の頻度や速度に直接比例する。

【0307】

あるいは、SECPのアッセイで*in vitro*でタンパク質フィラメントの形成を測定できる。ポリマー集合のための「臨界濃度」以上の濃度のSECP溶液を、カーボンでコートされたグリッドに置く。溶液中に好適な核形成部位を供給し得る。グリッドは、0.7%(w/v)の水溶性ウラニルアセテートでネガティブ染色し、電子顕微鏡検査により検査する。約25nm(微小管)、約8nm(アクチン)、または約10nm(中間径フィラメント)のフィラメントが現れると、SECP活性があることが証明される。

40

【0308】

別法では、SECPの活性は、SECPのタンパク質フィラメントへの結合によって測定される。 ^{35}S -メチオニンで標識されたSECPサンプルが好適なフィラメントタンパク質(アクチン、チューブリン、または中間径フィラメントタンパク質)とインキュベーションされ

50

、そのフィラメントタンパク質に対する抗体を用いる免疫沈降によって複合体タンパク質が回収される。その免疫沈降物は、その後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で走らせ、結合したSECPの量が測定される。

【0309】

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。

10

【0310】

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、ビオチンで標識される (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。

20

【0311】

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。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。

30

【0312】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明に記載した方法及びシステムの種々の改変を行い得る。本発明について説明するにあたり幾つかの実施例に関連して説明を行ったが、本発明の請求の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載する本発明の実施方法の様々な修正は、明確に特許請求の範囲内にあるものとする。

(表の簡単な説明)

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

40

【0313】

表2は、本発明のポリペプチド群の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。各ポリペプチドとそのGenBank相同体が一致する確率スコアも併せて示す。

【0314】

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

50

【0315】

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

【0316】

表5は、本発明のポリヌクレオチドの代表的なcDNAライブラリを示す。

【0317】

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。

【0318】

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

【0319】

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	CA2 試験
6024712	1	6024712CD1	24	6024712CB1	1840186CA2, 656258CA2, 90108583CA2
72176922	2	72176922CD1	25	72176922CB1	1392717CA2, 90066808CA2, 90066907CA2, 90066915CA2, 90066923CA2, 90066939CA2, 90067015CA2, 90067031CA2, 90067063CA2
1392717	3	1392717CD1	26	1392717CB1	5944001CA2
2701254	4	2701254CD1	27	2701254CB1	90067016CA2
71774318	5	71774318CD1	28	71774318CB1	3068613CA2
71802522	6	71802522CD1	29	71802522CB1	90092901CA2, 90092925CA2
6425956	7	6425956CD1	30	6425956CB1	90078552CA2, 90078560CA2, 90078576CA2, 90078584CA2
7494288	8	7494288CD1	31	7494288CB1	90055956CA2, 90055980CA2, 90055996CA2, 90056064CA2, 90056096CA2
7474330	9	7474330CD1	32	7474330CB1	6269343CA2, 6269670CA2
5911370	10	5911370CD1	33	5911370CB1	
7647134	11	7647134CD1	34	7647134CB1	
1631327	12	1631327CD1	35	1631327CB1	

【表 1 - 2】

表1-2

Incyte 外 ID	ポバブチド NO:	ポバブチド SEQ ID	Incyte ポバブチド ID	ポバブチド SEQ ID NO:	Incyte ポバブチド ID	CA2 試験
44232	13		044232CD1	36	044232CBI	216923CA2
560293	14		560293CD1	37	560293CBI	9005273CA2
2025618	15		2025618CD1	38	2025618CBI	
3342443	16		3342443CD1	39	3342443CBI	
2267957	17		2267957CD1	40	2267957CBI	90080362CA2, 90080370CA2, 90080394CA2, 90080462CA2, 90080470CA2, 90080478CA2
7480277	18		7480277CD1	41	7480277CBI	
3450647	19		3450647CD1	42	3450647CBI	3450647CA2
2053428	20		2053428CD1	43	2053428CBI	
7503614	21		7503614CD1	44	7503614CBI	
7503456	22		7503456CD1	45	7503456CBI	
7503459	23		7503459CD1	46	7503459CBI	

【 0 3 2 1 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GentBank ID NO.またはプロテオーム ID NO:	確率スコア	注釈
1	6024712CD1	g12331000	1.20E-180	[ヒト] 乳糖デヒドロゲナーゼ A
2	72176922CD1	g6563042	4.00E-13	[ヒト] 白血球関連 Ig 様受容体 1b
8	7494288CD1	g4049585	1.30E-19	[ヒト] Sirt-1 タンパク質 Itoh,A. 他 (1998) Brain Res. Mol. Brain Res. 62 (2), 175-186
9	7474330CD1	g15990853	0	[ヒト] コネキシン 40.1
10	5911370CD1	g790841	2.00E-25	[オオムギ] ガンマ-オオムギ
11	7647134CD1	g1469415	1.20E-215	[ヒト] ベアのボツスタタンパク質 PAX2 Sanyanusin,P. (1995) Nat. Genet. 9:358-364
12	16311327CD1	g13507259	0	[ヒト] ammonless
15	2025618CD1	g2947228	4.30E-16	[マウス] のマラリア原虫 (Plasmodium yoelii yoelii) 赤血球結合タンパク質
17	2267957CD1	g5532493	5.40E-21	[マウス] SLIT1
18	7480277CD1	g7529598	3.30E-119	[ヒト] JH402N21.3 (免疫グロブリン D 鎖を有する新規のタンパク質)
22	7503456CD1	g3549261	1.9E-12	[細胞性粘菌 (Dictyostelium discoideum)] jinteraptin Rivero, F. 他, J. Cell Biol. 142:735-750 (1998)
22	7503456CD1	252694 Y57 G11C.20	1.8E-11	[線虫] 線虫 K09F6.6 の推定パラログはミオシンファミリーメンバーである線虫 NMY-1 に類似性を有する。
22	7503456CD1	623900 MYH 3	1.70E-10	[ヒト] [モータータンパク質、加水分解酵素、ATP 分解酵素] 細胞質、細胞骨格収縮の力となる運動タンパク質ファミリーのメンバーである骨格筋のミオシン重鎖は胚形成時にのみ発現される。 Karsch-Mizraichi, I. 他, Nucleic Acids Res. 17:6167-79 (1989).
23	7503459CD1	g13872536	1.60E-12	[分裂酵母] コイルドコイル領域を有する仮説タンパク質、発芽酵母の YML071C に類似的。ロイシジンタンパク質を有する可能性がある。
23	7503459CD1	248546 R02 D3.2	5.5E-20	[線虫] ヒト Hs.177410 (ヒト GAP SH3 結合タンパク質 mRNA、完全なコード配列 (cds) に弱い類似性を有するタンパク質。 Jiang, M. 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:218-223(2001)

【 0 3 2 2 】

10

20

30

40

【表 3 - 1】

表3-1

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	Analytical Methods and Databases
1	6024712CD1	371	S11 S15 S294 S358 T52 T206 T259 T276 T348 T361	N127 N181	Signal_cleavage: M1-A29	SPSCAN
					乳酸リンゴ酸脱水素酵素: K61-K370	HMMER_PFAM
					膜貫通ドメイン: V62-L80, L148-Q165	TMAP
					L-乳酸脱水素酵素 BL00064: K61-K98, D121-P168, S176-H220, S221-L250, D262-S313, E325-L369	BLIMPS_BLOCKS
					リンゴ酸脱水素酵素タンパク質 BL00068: S129-F156, L172-G218, V239-D256	BLIMPS_BLOCKS
					L-乳酸脱水素酵素活性部位 Idh.prf: F209-D256	PROFILESKAN
					L-乳酸脱水素酵素シグネチャ PR00086: K61-D85, E86-F110, I173-S193, I197-Q215, W227-W240	BLIMPS_PRINTS
					脱水素酵素酸化還元酵素 NAD リンゴ酸 L 乳酸 解糖酸 トリカルボン酸サイクル 多量伝子多重遺伝子 PD000350: K61-E364	BLAST_PRODOM
					L-乳酸脱水素酵素 DM00253	BLAST_DOMO
					P04642 18-330: S60-K370	
					P07864 17-329: K61-L369	
					I6276 19-331: H59-K370	
					P3357 20-332: H59-L369	
					L-乳酸脱水素酵素活性部位: L229-S235	MOTIFS
2	72176922CD1	236	S128 S164 S165 S169 S174 S189 S197 T221 Y68 S37 S73 T46 Y94 T118 T170 T205	N44 N55 N64	シグナルペプチド: M1-G16	HMMER
					免疫グロブリン ドメイン: E42-Y98	HMMER_PFAM

10

20

30

40

【表 3 - 2】

表3-2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	Analytical Methods and Databases
3	1392717CD1	107	S5 S44 S84	N82	膜貫通ドメイン: T133-R158 N 末端は細胞質ソル内にはない signal_cleavage: M1-A36	SPSCAN TMAP
4	2701254CD1	124	S76		膜貫通ドメイン: T21-V42 N 末端は細胞質ソル内にはない。 signal_cleavage: M1-A36	SPSCAN HMMER
5	71774318CD1	144	S81		シグナルペプチド: M1-P27, M1-A31 signal_cleavage: M1-G29	SPSCAN HMMER
6	71802522CD1	202	S11 S19 S53 S82 S160 T2 T109 T151		シグナルペプチド: M1-P34 signal_cleavage: M1-G52	SPSCAN
					シグナルペプチド: L30-A38 膜貫通ドメイン: P33-S53, V119-W142	HMMER TMAP
7	6425956CD1	207	S82 S84 S115 S148 S166 T134		N 末端は細胞質ソル内にはない signal_cleavage: M1-G50	SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-P46, R21-G50 膜貫通ドメイン: H27-G52	HMMER TMAP
8	7494288CD1	291	S96 S143 T6 T86 Y214	N112 N141 N167	N 末端は細胞質ソル内にはない signal_cleavage: M26-S75	SPSCAN
8 (cont.)					シグナルペプチド: P54-T79, M44-S80, M61-T79	HMMER
					ロインシッチレポート: Q206-P229, D109-M132, E133-K156, R157-H180, G181-M205	HMMER_Pfam

【 0 3 2 4 】

10

20

30

40

【表 3 - 3】

表3-3

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	Analytical Methods and Databases
					ロイシンリッチリポーター C 末端ドメイン: N239-K283 ロイシンリッチリポーター N 末端ドメイン: S80-P107 膜貫通ドメイン: P56-H74 N 末端は細胞質シド内がない	HMMER_PFAM HMMER_PFAM TMAP
9	7474330CD1	356	S205 S221 S226 S263 S268 S287 S289 S311 T137 T178 T237 T267		ロイシンリッチリポーターシグネチャ: A155-F168, L158-V171 ロイシンリッチリポーターモチーフ: L137-L158 コネキシン: M1-S205	BLIMPS_PRINTS MOTIFS HMMER_PFAM
					シグナルペプチド: M1-Q32 膜貫通ドメイン: S4-R28, L61-L89, S126-L154, E179-V203 コネキシンタンパク質 BL00407: P57-H84, P123-G152, C161-S205, A26-S56	HMMER TMAP BLIMPS_BLOCKS
					コネキシンシグネチャ connexins 1.prf: M20-V71 コネキシンシグネチャ connexins 2.prf: A141-L197	PROFILESCAN PROFILESCAN
9 (cont.)					コネキシン シグネチャ PR00206: P7-Y31, F38-H60, F63-L83, F125-F151, C161-S181, L182-S205 キップ結合 コネキシン タンパク質 膜貫通 ALPHA1 CX43 ALPHAB ALPHAS BETA1 PD001135: S4-R85, Y129-L202	BLIMPS_PRINTS BLAST_PRODOM
					コネキシン DM00590 P352 I-278: S4-S221	BLAST_DOMO
					コネキシン DM00590 P18860 I-278: S4-L202	BLAST_DOMO
					コネキシン DM00590 P28228 I-304: S4-L89	BLAST_DOMO
					コネキシン DM00590 P41987 I-277: S4-S226	BLAST_DOMO
					コネキシン シグネチャ 1: C40-D53	MOTIFS
					コネキシン シグネチャ 2: C161-P177	MOTIFS

表3-4

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	Analytical Methods and Databases
10	5911370CD1	82	S21 S51		signal_cleavage: M1-G25 シグナルペプチド: M1-D24, M1-G25, M1-T27, M1-M31 カンマ-チオニオンアミド: R36-C82 膜貫通ドメイン: I4-Y23 N末端は細胞質シド内にはない カンマ-チオニオンアミドタンパク質 BL00940: R36-C59, C71-C82	SPSCAN HMMER HMMER_PFAM TMAP
11	7647134CD1	529	S32 S75 S175 S294 S340 S344 S370 S509 T38 T43 T190 T324 T409 T427 Y307 Y371	N224 N416	カンマ-チオニオンアミド DM00833 P21923 L-46: R36-C82 ATP/GTP 結合部位モチーフ A (P-loop) : A35-S42 カンマ-チオニオンアミドシグネチャ: R36-C59 シグナルペプチド: M1-S27	BLIMPS_BLOCKS BLAST_DOMO MOTIFS MOTIFS HMMER
11 (cont.)					シグナルペプチド: M1-C28 signal_cleavage: M1-A26 ヘアピン-ボックスドメイン: G114-R238 ヘアピン-ボックスドメインタンパク質 BL00034: G114-S164, G168-N204, F208-R238, S269-P279 ヘアピン-ボックスドメインシグネチャ: G128-S184 ヘアピン-ボックスシグネチャ PR00027: V118-D133, R136-R154, L156-T173, G174-P191 タンパク質ヘアピン-ボックス核 DNA 結合 発生 ホメオボックス転写調節 PAX6 PD000643: G114-R238	HMMER SPSCAN HMMER_PFAM BLIMPS_BLOCKS PROFILESCAN BLIMPS_PRINTS BLAST_PRODOM

10

20

30

40

【表 3 - 5】

表3-5

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	Analytical Methods and Databases
					タンパク質 ペア化ボックス DNA 結合 発生 核転写調節分 化選択 PD002426: G414-P493	BLAST_PRODOM
					ペア化ボックス タンパク質 ペア化ボックス DNA 結合 発生タン パク質 核タンパク質 PD072729: P334-N410	BLAST_PRODOM
					タンパク質 ペア化ボックス DNA 結合 発生 核転写調節分 化選択 PD004047: P334-N410	BLAST_PRODOM
11 (cont.)					ペア化ボックス DM00579Q02962 13-126: M11-D225	BLAST_DOMO
					ペア化ボックス DM00579S36156 12-125: A110-D225	BLAST_DOMO
					ペア化ボックス DM00579Q02548 13-126: G114-D225	BLAST_DOMO
					ペア化ボックス DM00579Q02650 13-126: G114-D225	BLAST_DOMO
					ペア化ボックスドメインシグネチャ: R148-S164	MOTIFS
12	I631327CD1	453	S92 S107 S111 S120 S149 S297 S426 T28 T174 T345 T414	N35	シグナルペプチド: M1-V20	HMMER
					シグナルペプチド: M1-S21, M1-L23, M1-W24, M1-A19	HMMER
					膜貫通ドメイン: W354-L382 N 末端は細胞質ソル内	TMAP
13	O44232CD1	271	S17 S132 S160 S229 S230 S253 T191 T260 Y244	N85 N218	シグナルペプチド: L54-C72	HMMER
					シグナルペプチド: L54-Y74, L53-S73, V51-C72, Signal_cleavage: M7-C72	HMMER
					膜貫通ドメイン: P42-V70, L90-Y113, G165-K193 N 末端は細胞質ソル内にならない	SPSCAN TMAP

10

20

30

40

【 0 3 2 7 】

【表 3 - 6】

表3-6

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	Analytical Methods and Databases
14	560293CD1	203	S21 S73 T6 T144 Y83		シグナルペプチド: P19-A46	HMMER
15	2025618CD1	529	S104 S116 S195 S206 S216 S307 S370 S464 T65 T119 T168 T187 T208 T228 T270 T283 T313 T499 T520	N63 N480	Signal cleavage: M1-A56 シグナルペプチド: M1-V20, M1-A19, M1-A23, M1-G24, M1-T27	SPSCAN HMMER
					膜貫通ドメイン: L4-T29	TMAP
					Signal cleavage: M1-G18	SPSCAN
					タンパク質 コイルドコイル鎖 ミオシン リピート 重 ATP 結合 フィラメント ヘプタド PD000002: M272-E478	BLAST_PRODOM
					タンパク質 リピート トロポモニン コイルドコイル 選択的スライシング シグナル 前駆体鎖 PD000023: E273-N479	BLAST_PRODOM
					トロポモニン DM00077P53935S80-755: L300-Q467	BLAST_DOMO
					カルデスモン (CALDESMON) DM06224P12957I-755: Q95-N479	BLAST_DOMO
					trichahyalin DM03839P37709I632-1103: K59-K476	BLAST_DOMO
16	3342443CD1	305	S143 S238 S286 T22 T51 T67 T150 T249	N78 N82	signal cleavage: M1-G20	SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-G20, M1-R19, M1-Q21, M1-Q24, M1-E26	HMMER
					u-PAR/Ly-6 ドメイン: T124-P140	HMMER_PFAM

10

20

30

40

【 0 3 2 8 】

【表 3 - 7】

表3-7

SEQ ID NO:	inocyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	Analytical Methods and Databases
17	2267957CD1	493	S194 S243 S256 S477 T124 T188 T347 T469	N72 N264 N315 N349 N360	Ly-6/uc-PAR ドメインタンパク質 BL00983: S59-C68, E122-N137 シグナルペプチド: P7-A27, M1-R26, M1-A30, L10-R29, M1-R29 signal_cleavage: M1-A27 ロインシグナルペプチド: Q159-A182, V135-A158, Y62-R84, N111-Q134, K186-P209, Q87-P110 ロインシグナルペプチド C 末端ドメイン: N221-G271 免疫グロブリンドメイン: G283-A343 縦貫通ドメイン: G9-A30 N371-W399 ロインシグナルペプチドシグネチャ PF00019: L112-L125 ロインシグナルペプチドシグネチャ L45-L66 L52-L73 L115-L136 L356-L377 シグナルペプチド: M1-R17, M1-Y22	BLIMPS_BLOCKS HMMER
18	7480277CD1	869	S44 S78 S80 S121 S128 S181 S198 S257 S276 S344 S431 S449 S479 S668 S783 T49 T92 T187 T252 T311 T316 T463 T540 T648 T750 T761 T863	N42 N90 N131 N232 N455 N587 N666	Signal_cleavage: M1-G18 MAM ドメイン: C593-R758 免疫グロブリンドメイン: G53-A110, G353-V417, C601-S675, G150-A217, G256-T316 MAM ドメインタンパク質 BL00740: C601-W613, L741-T761	SPSCAN HMMER_PFAM HMMER_PFAM BLIMPS_BLOCKS

【 0 3 2 9 】

10

20

30

40

【表 3 - 8】

表3-8

SEQ ID NO:	Inocyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	Analytical Methods and Databases
18 (cont.)					MAM ドメインシグネチャ PR00020: K599-N617, Y672-K683, V720-G734, G739-K752	BLIMPS_PRINTS
					前駆体 糖タンパク質 シグナル 膜貫通 加水分解酵素 タンパク質 リピート 受容体 ホスホターゼ ニューロピリン PD001482: D590-C756	BLAST_PRODOM
					MAM DM01344 P28824 S95-796: L552-D747	BLAST_DOMO
					タンパク質-チロシン-ホスファターゼ、受容体タイプ MU DM07136 P35822 I-187: P577-V749	BLAST_DOMO
					MAM DM01344 P98072 S2-509: N587-D748	BLAST_DOMO
19	3450647CD1	174	S42		MAM DM01344 A55620 618-796: T592-G742	BLAST_DOMO
					シグナルペプチド: M1-C18, M1-S21	HMMER
					シグナル切断: M1-V19	SPSCAN
					膜貫通ドメイン: T84-Y108 H144-S163	TMAP
					N 末端は細胞質リル内にない	
					マスピンシグネチャ: S61-G79	BLIMPS_PRINTS
20	2053428CD1	561	S21 S83 S151 S164 S196 S216 S321 S515 T124 T266 T335 Y76 Y215 Y424	N337	シグナルペプチド: M28-L45	HMMER
					シグナル切断: M1-G46	SPSCAN
					膜貫通ドメイン: M454-R477	TMAP
					N 末端は細胞質リル内にない	
					R02D3.2 タンパク質 PD147543: E79-G555	BLAST_PRODOM
					PI008 タンパク質 PD138971: D72-D322	BLAST_PRODOM
21	7503614CD1	219	S21 S73 T6 T171 Y83		signal_cleavage: M1-A56	SPSCAN

【表 3 - 9】

表3-9

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的に酸化部位	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	Analytical Methods and Databases
22	7503456CD1	497	S104 S116 S195 S206 S216 S307 S370 T65 T119 T168 T187 T208 T228 T270 T283 T313 T467 T488	N63 N448	細胞質ソルドメイン: M215-D219 膜貫通ドメイン: P192-L214 非細胞質ソルドメイン: M1-G191 リソソーム蛋白質 P2 シグネチャ PR00456: R24-S35, S35-A49 signal_cleavage: M1-G18	TMHMMER BLIMPS_PRINTS SPSCAN
					シグナルペプチド: M1-G18, M1-A21, M1-G22, M1-A25, M1-G28 細胞質ソルドメイン: M1-T6 膜貫通ドメイン: V7-T29 非細胞質ソルドメイン: G30-V497 タンパク質 コイルドコイル鎖 ミオシン リポート 重 ATP 結合 フィラメント ヘプタド PD0000002: M272-K469, K260-K469	HMMER TMHMMER BLAST_PRODUM
23	7503459CD1	310	S21 S83 S151 S164 S196 S216 S296 S307 T124 T266 Y76 Y215		タンパク質 リポートトロポミオン コイルドコイル 選択的スプライ シグ シグナル 前駆体鎖 PD000023: Q284-E446, K266-K469 トロポミオン DM00077P5393S1580-755: L300-L456 シグナルペプチド: M28-A44, M28-G46	BLAST_DOMO HMMER
					Gタンパク質 共役受容体シグネチャ: S163-I179	MOTIFS

【 0 3 3 1 】

10

20

30

40

【表 3 - 1 0】

表3-10

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	Analytical Methods and Databases
					ロイジンジグパーバターン: L88-L109	MOTIFS

【 0 3 3 2】

10

20

30

40

表4-1

ボリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 名	配列断片
24/6024712CB1/ 1197	1-455, 1-740, 82-211, 208-1197
25/72176922CB1/ 1001	1-148, 1-222, 1-228, 1-238, 1-266, 1-323, 1-376, 1-380, 1-431, 1-440, 1-445, 1-455, 1-466, 1-491, 1-499, 1-548, 1-554, 1-562, 1-565, 1-567, 1-573, 1-590, 1-608, 1-613, 1-630, 1-653, 1-664, 1-677, 1-687, 1-689, 1-711, 1-722, 5-545, 11-233, 25-492, 38-560, 38-725, 42-208, 56-303, 149-427, 169-461, 202-427, 251-998, 285-761, 335-541, 335-977, 340-979, 359-588, 360-978, 370-622, 396-1001, 404-830, 419-973, 438-973, 448-984, 451-1000, 457-891, 466-540, 503-961, 506-1000, 535-973, 549-999, 557-973, 563-948, 570-989, 576-983, 580-998, 583-973, 612-1000, 621-1000, 633-976, 660-984, 661-1001, 671-984, 674-984, 713-973, 740-936, 740-984, 740-991, 794-984, 823-984, 852-971
26/1392717CB1/1174	1-267, 1-271, 1-753, 7-223, 116-269, 116-357, 116-387, 116-409, 116-412, 116-616, 120-381, 120-503, 125-412, 133-553, 135-374, 139-279, 150-330, 152-317, 154-371, 154-648, 155-281, 155-384, 156-679, 165-378, 166-420, 166-689, 168-295, 168-312, 168-319, 168-354, 171-311, 171-356, 171-359, 228-456, 266-880, 275-754, 308-563, 312-556, 354-603, 367-938, 386-694, 422-665, 423-675, 427-682, 469-1140, 474-696, 551-836, 574-889, 597-837, 597-847, 646-1107, 673-1116, 673-1147, 673-1156, 690-1113, 690-1174, 691-1165, 700-1159, 713-993, 720-973, 732-994, 736-1010, 744-1159, 745-1157, 776-1159, 778-929, 791-1157, 797-1139, 814-1156, 825-1157, 839-1097, 841-1157, 851-1157, 904-1155, 906-1174, 907-1155, 910-1157, 914-1145, 956-1157, 958-1156, 959-1120, 961-1166, 1008-1157, 1070-1174
27/2701254CB1/ 948	1-657, 229-662, 382-669, 382-948, 520-827

表4-2

ポリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 示 リヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
28/71774318CBI/ 2403	1-421, 100-766, 203-785, 224-893, 311-855, 372-892, 382-604, 415-1020, 424-1015, 435-1043, 444-994, 468-1069, 486-1178, 489-1160, 494-1171, 527-1069, 535-1125, 535-1159, 541-1062, 558-1070, 595-1123, 605-1227, 616-1200, 661-1197, 673-1250, 678-1341, 684-1269, 743-1480, 751-1282, 759-1336, 776-1327, 787-1435, 823-1352, 851-1370, 901-1603, 944-1635, 1006-1580, 1017-1570, 1043-1682, 1052-1629, 1065-1606, 1066-1684, 1073-1668, 1074-1742, 1083-1577, 1103-1758, 1107-1761, 1107-1764, 1119-1647, 1135-1749, 1173-1674, 1259-1881, 1263-1897, 1284-1942, 1289-1934, 1298-1960, 1308-2033, 1323-1951, 1368-2054, 1414-2001, 1433-2052, 1601-2252, 1603-2162, 1743-2248, 1758-2403, 1759-2299, 1774-2394, 1781-2318, 1823-2387
29/71802522CBI/ 2848	1-639, 442-925, 442-954, 442-1044, 442-1084, 461-1112, 466-991, 645-1285, 703-1371, 841-1478, 903-1474, 913-1526, 1087-1764, 1104-1739, 1203-1702, 1213-1862, 1290-1826, 1327-1849, 1362-1915, 1375-2011, 1398-2101, 1412-2009, 1419-2122, 1451-2028, 1466-2050, 1491-2083, 1510-2079, 1530-2081, 1552-2163, 1563-2028, 1565-2142, 1565-2202, 1583-2101, 1583-2127, 1612-2197, 1618-2266, 1638-2238, 1645-2305, 1687-2349, 1695-2362, 1708-2253, 1718-2083, 1762-2433, 1779-2246, 1844-1982, 1884-2543, 1885-2539, 1901-2521, 1913-2626, 1990-2551, 2104-2699, 2193-2848, 2240-2848, 2283-2848, 2297-2848, 2350-2848, 2366-2848, 2401-2805, 2542-2848

10

20

30

40

表4-3

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ incyte 求 リスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
30/6425956CBI/ 3394	1-832, 240-835, 246-1096, 760-1000, 814-1457, 831-1108, 946-1308, 1179-1482, 1215-1905, 1254-1717, 1254-1807, 1254-1884, 1254-1923, 1267-1746, 1294-1626, 1397-1865, 1434-1865, 1692-1935, 1692-2219, 1692-2233, 1692-2246, 1692-2277, 1692-2325, 1692-2337, 1692-2376, 1692-2426, 1692-2434, 1692-2547, 1693-2052, 1696-2105, 1696-2274, 1696-2431, 1696-2453, 1697-2444, 1708-1823, 1802-2099, 1802-2396, 1824-2387, 1831-2073, 1850-2126, 1907-2469, 1912-2618, 1921-2324, 1929-2098, 1929-2404, 1931-2408, 1932-2560, 2001-2652, 2008-2277, 2008-2569, 2026-2477, 2037-2500, 2084-2728, 2096-2544, 2098-2275, 2101-2669, 2119-2679, 2144-2496, 2145-2679, 2158-2839, 2167-2714, 2178-2612, 2182-2438, 2205-2695, 2238-2772, 2250-2792, 2257-2849, 2301-2544, 2311-2851, 2313-2570, 2315-2616, 2324-2773, 2348-2607, 2370-2753, 2373-3053, 2375-2894, 2424-2838, 2440-2999, 2448-2782, 2448-2951, 2452-2792, 2455-2687, 2456-2968, 2464-2991, 2482-2703, 2488-2972, 2493-2860, 2497-2677, 2497-3004, 2498-2808, 2503-2907, 2503-3194, 2505-2861, 2518-2804, 2548-3133, 2549-2997, 2550-2603, 2551-2808, 2569-3010, 2573-3015, 2584-2849, 2586-2832, 2586-2927, 2587-3014, 2586-3216, 2601
31/7494288CBI/ 1858	2809, 2618-3276, 2620-3122, 2651-3331, 2669-2832, 2677-3155, 2684- 3100, 2687-3354, 2708-2948, 2710-3368, 2755-3027, 2765-3312, 2784- 3060, 2790-3094, 2792-3394, 2814-3331, 2826-3336, 2835-3338, 2840- 3364, 2852-3365, 2853-3387, 2865-3366, 2870-3394, 2871-3017, 2889- 3368, 2893-3037, 2898-3394, 2925-3153, 2948-3394, 2958-3376, 2963- 3366, 2969-3376, 2977-3376, 2983-3394, 2984-3366, 2987-3261, 3000- 3317, 3011-3268, 3038-3369, 3038-3371, 3056-3170, 3057-3369, 3080- 3391, 3109-3386, 3144-3368, 3146-3379, 3147-3394, 3174-3376, 3176- 3394, 3248-3394
32/7474330CBI/ 1242	1-589, 1-692, 1-1858, 365-980, 421-646, 506-1195, 534-1176, 538-786, 539-1126, 951-1590, 958-1197, 961-1522, 963-1472, 966-1472, 1055- 1231, 1440-1529
33/5911370CBI/544	1-539, 179-1228, 1064-1242
	1-295, 1-313, 1-482, 1-524, 1-544, 9-491, 9-542, 9-544, 14-509, 38- 488, 38-542, 38-544

【表 4 - 4】

表4-4

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 求 リスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
34/7647134CBI/ 3471	1-3471, 510-586, 514-586, 520-958, 522-1159, 550-881, 587-711, 587-763, 587-825, 587-834, 587-870, 587-880, 587-914, 587-947, 587-949, 587-964, 587-978, 587-988, 587-1024, 587-1046, 589-828, 590-702, 592-661, 592-864, 618-685, 618-1114, 633-1136, 633-1156, 633-1159, 637-1159, 650-1159, 663-1159, 669-1159, 678-1159, 685-1159, 697-921, 707-1003, 707-1008, 720-916, 720-972, 723-1065, 723-1159, 727-972, 727-1159, 751-1159, 755-1159, 759-1159, 773-1048, 774-1159, 780-1159, 782-841, 786-1063, 812-1159, 826-1159, 827-1159, 843-1159, 851-1159, 859-1159, 860-958, 891-1159, 895-1159, 898-1159, 952-1159, 959-1140, 979-1159, 984-1087, 987-1159, 1007-1159, 1010-1159, 1017-1159, 1029-1159, 1029-1166, 1032-1159, 1052-1159, 1069-1159, 1100-1159, 1118-1159, 1128-1159, 1129-1159, 1227-1250, 1227-1253, 1227-1255, 1227-1284, 1227-1266, 1227-1311, 1227-1342, 1227-1363, 1227-1378, 1227-1380, 1227-1396, 1227-1406, 1227-1407, 1227-1414, 1227-1453, 1227-1490, 1227-1511, 1227-1530, 1227-1532, 1227-1533, 1227-1573, 1227-1609, 1227-1610, 1227-1631, 1227-1636, 1231-1533, 1240-1533, 1242-1533, 1270-1407, 1272-1533, 1274-1533, 1280-1435, 1280-1533, 1301-1533, 1313-1533, 1318-1407, 1323-1533, 1324-1533, 1354-1533, 1350-1533, 1366-1533, 1385-1533, 1410-1911, 1452-1533, 2057-2166, 2128-2315, 2263-2568, 2437-2682, 2437-2923, 2483-2724, 2488-3058, 2751-3040, 2810-3230, 3034-2286, 3079-3359, 3214-3360, 3303-3467

表4-5

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
35/1631327CBI/1484	1-155, 1-569, 5-721, 6-235, 8-68, 15-284, 20-231, 20-296, 20-552, 21-245, 21-482, 27-647, 28-486, 29-300, 29-487, 30-498, 35-581, 37-640, 56-582, 69-279, 69-423, 69-716, 71-536, 80-724, 106-721, 132-326, 220-723, 224-723, 225-724, 226-724, 227-704, 228-704, 228-723, 228-724, 229-684, 229-694, 230-684, 230-694, 231-687, 232-684, 232-694, 233-675, 233-692, 233-694, 233-722, 233-724, 234-684, 234-694, 234-724, 236-723, 237-694, 238-724, 239-724, 240-724, 241-724, 243-704, 246-704, 247-706, 249-719, 249-724, 251-684, 252-694, 254-704, 257-654, 258-724, 280-706, 286-694, 286-724, 287-697, 287-724, 288-694, 288-724, 290-694, 291-694, 291-704, 292-690, 292-694, 292-704, 292-706, 292-718, 297-724, 302-724, 304-704, 306-706, 308-694, 309-724, 310-724, 312-724, 314-679, 318-676, 318-705, 321-691, 321-694, 321-704, 321-723, 321-724, 321-869, 327-684, 333-694, 333-720, 336-699, 336-706, 341-723, 342-694, 342-724, 345-694, 357-696, 359-694, 360-706, 361-682, 368-724, 372-505, 378-724, 383-694, 389-338, 407-704, 411-723, 413-684, 413-694, 420-723, 427-538, 427-724, 429-538, 429-684, 430-704, 431-720, 431-724, 434-694, 448-724, 449-704, 457-715, 458-704, 459-538, 462-694, 462-706, 467-538, 478-538, 478-704, 480-712, 491-724, 492-720, 498-684, 514-694, 518-538, 528-1065, 538-694, 538-695, 538-704, 538-719, 538-723, 538-724, 539-724, 560-1237, 582-704, 643-1205, 680-1219, 829-1323, 837-1298, 849-1072, 866-1415, 901-1323, 913-1322, 932-1314, 933-1289, 940-1313, 940-1327, 1000-1484, 1003-1484, 1005-1322, 1032-1282, 1033-1298, 1072-1209
35 (cont.)	1-350, 9-185, 28-288, 28-568, 29-269, 29-483, 29-584, 29-617, 29-631, 29-648, 29-668, 30-269, 30-463, 30-652, 31-650, 32-377, 33-390, 34-186, 43-557, 51-166, 51-283, 56-266, 61-294, 62-350, 63-385, 64-244, 69-672, 174-421, 202-701, 203-806, 203-809, 205-782, 225-797, 294-514, 531-730, 541-817, 587-1111, 588-874, 612-742, 626-909, 652-1305, 782-1225, 789-1264, 789-1387, 793-1068, 797-1365, 806-1416, 815-1441, 842-1092, 843-1137, 910-1441, 953-1244, 1049-1416, 1100-1361, 1307-1773, 1609-1686, 1699-1744
36/044232CBI/1773	

表4-6

ボリスクレオチド SEQ ID NO/ Inocyte ポ リスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
37/560293CB1/ 2016	1-504, 24-144, 38-327, 38-570, 42-352, 42-430, 42-524, 42-581, 42- 615, 44-424, 62-389, 69-424, 76-646, 91-696, 120-169, 136-703, 146- 440, 149-328, 172-595, 184-703, 191-685, 205-703, 208-671, 210-671, 211-667, 211-671, 213-804, 215-679, 217-679, 221-679, 222-679, 222- 703, 223-679, 226-683, 230-679, 237-685, 244-671, 245-703, 247-632, 248-606, 250-641, 260-679, 262-685, 271-679, 274-634, 280-671, 280- 679, 281-679, 282-671, 283-679, 286-700, 289-703, 295-671, 299-679, 300-703, 302-649, 302-703, 306-703, 312-703, 319-679, 323-701, 326- 599, 327-635, 328-663, 338-675, 354-703, 364-671, 375-703, 378-703, 413-703, 421-703, 429-703, 434-703, 460-703, 476-703, 495-703, 515- 703, 527-679, 540-1164, 583-647, 583-685, 587-663, 659-804, 728-931, 729-888, 729-989, 729-1020, 729-1080, 729-1149, 729-1153, 729-1159, 729-1197, 729-1200, 729-1203, 729-1206, 729-1216, 729-1224, 729- 1226, 729-1283, 729-1287, 729-1355, 730-1257, 731-1072, 732-872, 732-888, 734-888, 734-1152, 734-1182, 737-1098, 737-1195, 738-1263, 741-1235, 741-1322, 747-1202, 747-1210, 748-984, 748-1081, 749-988, 750-1122, 756-1122, 757-1207, 759-1167, 760-955, 760-1237, 764-950, 766-1054, 776-976, 777-1204, 790-976. 790-1031, 791-1291, 792-1413, 796-1322, 818-1110, 818-1150, 818- 1159, 818-1195, 818-1196, 818-1208, 822-1074, 822-1508, 848-1059, 848-1091, 864-1203, 899-1217, 901-1153, 909-1513, 936-1516, 974- 1175, 977-1239, 978-1189, 989-1349, 990-1231, 1010-1278, 1074-1347, 1088-1391, 1097-1239, 1121-1292, 1121-1367, 1135-1401, 1136-1305, 1152-1367, 1152-1408, 1154-1380, 1171-1349, 1171-1381, 1171-1394, 1179-1395, 1194-1451, 1200-1505, 1200-1540, 1202-1449, 1209-1489, 1254-1546, 1276-1429, 1306-1542, 1313-1523, 1314-1555, 1314-1652, 1343-1696, 1344-1582, 1345-1521, 1349-1570, 1360-1596, 1375-1569, 1392-1629, 1402-1646, 1402-1877, 1462-1691, 1473-1699, 1473-1789, 1473-1814, 1504-1720, 1517-1916, 1548-1805, 1554-1706, 1567-1809, 1573-1852, 1617-1851, 1767-2016
37 (cont.)	

表4-7

ホリスクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ホリスクレオチド ID/ 配列長	配列断片
38/2025618CB1/ 2520	1-300, 1-508, 1-550, 28-449, 35-615, 216-771, 223-347, 312-595, 312-885, 349-596, 360-784, 365-899, 404-690, 453-1028, 475-744, 516-764, 534-803, 586-851, 658-1203, 696-1026, 810-1122, 967-1200, 967-1432, 1025-1197, 1026-1258, 1027-1440, 1031-1333, 1131-1359, 1136-1384, 1168-1562, 1168-1569, 1179-1609, 1288-1720, 1345-1914, 1353-1639, 1353-1649, 1399-1656, 1485-1778, 1490-1770, 1521-2204, 1535-1717, 1555-2164, 1590-2148, 1608-2203, 1614-1898, 1680-1907, 1688-1976, 1781-2374, 1904-2214, 1959-2383, 2002-2384, 2014-2219, 2056-2084, 2093-2321, 2102-2383, 2125-2219, 2248-2320
39/3342443CB1/ 1036	1-70, 1-207, 1-266, 20-269, 20-357, 24-356, 24-466, 69-138, 122-373, 400-1036, 469-953
40/2267957CB1/ 1621	1-1621, 120-1018, 120-1128, 128-756, 538-1235, 559-790, 559-1003, 559-1080, 1191-1431, 1191-1601
41/7480277CB1/ 3562	1-186, 1-946, 187-946, 630-1161, 819-1267, 852-1266, 1018-1334, 1207-1664, 1334-3562
42/3450647CB1/ 899	1-474, 1-503, 50-293, 50-433, 50-518, 50-541, 50-648, 50-778, 50-805, 50-809, 52-420, 52-635, 52-692, 52-727, 52-809, 52-885, 52-899, 55-832, 91-899, 253-899, 282-898, 303-899, 328-899, 359-899, 395-899, 423-500, 456-899, 482-899, 504-899, 568-899, 570-899
43/2053428CB1/ 2330	1-880, 532-699, 532-793, 642-899, 645-886, 645-889, 650-833, 650-871, 652-883, 652-903, 652-917, 653-858, 653-871, 653-909, 653-917, 653-924, 653-940, 653-994, 653-1059, 653-1239, 654-815, 654-948, 655-1027, 660-1268, 671-1351, 672-1158, 868-1511, 907-1630, 914-1498, 940-1245, 1047-1307, 1080-1362, 1097-1282, 1097-1452, 1097-1480, 1207-1805, 1233-1485, 1324-1928, 1355-1893, 1355-1903, 1366-2019, 1381-1637, 1381-1679, 1401-1902, 1417-1644, 1417-1760, 1446-1879, 1450-1677, 1474-1774, 1508-1731, 1590-1844, 1590-2105, 1603-1884, 1606-2148, 1607-1873, 1619-1837, 1619-1850, 1629-2245, 1645-1899, 1698-1977, 1700-1927, 1728-1928, 1765-2330, 1800-2054, 1809-2296, 1822-2210, 1881-2397, 1896-2306, 1899-2254, 1916-2306, 1918-2301, 1928-2305, 1945-2306, 1971-2306, 2019-2230, 2077-2301

表4-8

ボリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte 求 リヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
44/7503614CB1/ 1755	1-202, 1-207, 1-310, 1-478, 1-1755, 12-301, 13-299, 13-544, 14-251, 16-165, 16-289, 16-326, 16-404, 16-555, 16-589, 51-620, 65-670, 110-659, 153-780, 153-797, 153-822, 153-828, 153-831, 153-840, 153-842, 153-879, 153-950, 158-659, 158-665, 161-663, 165-659, 178-677, 182-645, 184-645, 185-641, 185-645, 186-677, 189-653, 191-653, 195-653, 196-653, 196-677, 197-653, 200-657, 202-669, 204-653, 206-632, 211-659, 218-645, 219-667, 221-606, 222-580, 224-615, 234-653, 236-659, 245-653, 248-608, 254-645, 254-653, 255-653, 256-645, 257-653, 260-669, 263-677, 269-645, 273-653, 275-637, 276-619, 276-669, 280-669, 280-677, 286-677, 293-653, 301-609, 302-637, 312-649, 318-677, 338-645, 352-669, 354-543, 354-665, 370-600, 379-564, 380-591, 387-677, 395-677, 403-677, 408-677, 424-602, 428-600, 434-677, 456-669, 469-677, 489-677, 501-653, 703-950, 709-862, 712-862, 720-950, 734-929, 738-924, 750-1001, 764-950, 792-885, 984-1036, 1099-1354, 1141-1385, 1141-1616, 1282-1618, 1306-1548, 1362-1618, 1418-1618, 1466-1655, 1506-1755, 1531-1657
45/7503456CB1/ 2427	1-511, 3-2427, 1421-1618, 1421-1619, 1436-2111, 1439-1664, 1439-1703, 1439-1707, 1462-2071, 1490-2086, 1497-2055, 1515-2110, 1521-1805, 1548-2396, 1550-2396, 1554-2396, 1557-2389, 1568-2395, 1587-1814, 1595-1883, 1601-2396, 1654-2396, 1657-2126, 1667-2112, 1679-1795, 1680-2126, 1681-2386, 1685-2129, 1697-2118, 1705-2132, 1811-2121, 1866-2290, 1909-2291, 1921-2126, 2000-2228, 2009-2290, 2155-2427
46/7503459CB1/ 1685	1-1661, 7-566, 322-1042, 329-585, 331-1040, 331-1073, 332-575, 336-557, 338-569, 339-610, 339-626, 339-680, 339-925, 340-1042, 341-501, 341-634, 341-745, 347-954, 357-1037, 358-844, 626-931, 734-993, 766-1048, 783-968, 848-1087, 859-1080, 1024-1284, 1030-1285, 1109-1283, 1120-1685, 1142-1615, 1155-1409, 1164-1651, 1180-1565, 1212-1660, 1216-1337, 1236-1652, 1251-1661, 1254-1609, 1273-1656, 1283-1660, 1300-1661, 1326-1661, 1374-1585, 1432-1656

【表 5】

表 5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクトID	代表的ライブラリ
24	6024712CB1	TESTNOT11
25	72176922CB1	EOSIHET02
26	1392717CB1	THYRNOT03
27	2701254CB1	OVARFUT10
29	71802522CB1	UTRSNOR01
30	6425956CB1	LUNGNON07
31	7494288CB1	BRAIFER05
33	5911370CB1	BRAIFEN03
34	7647134CB1	KIDCTME01
35	1631327CB1	SINTNOR01
36	044232CB1	QVARDIR01
37	560293CB1	LUNGFET03
38	2025618CB1	LUNGNON03
39	3342443CB1	SPLANNOT09
40	2267957CB1	UTRSNOT02
41	7480277CB1	ADRETUE04
42	3450647CB1	UTRSNON03
43	2053428CB1	PROSTUS20
44	7503614CB1	COLHTUS02
45	7503456CB1	BRAINOT09
46	7503459CB1	293TF1T01

10

20

30

【 0 3 4 1 】

【表 6 - 1】

表6-1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
293TFT01	pINCY	ライブラリは腎臓上皮組織由来の形質転換胚性細胞株(293-EBNA)から単離した RNA を用いて作製した。この細胞はアデノウイルス5DNA で形質転換した。
ADRETUE04	PCDNA2.1	この5プライムに偏向してランダムプライムされたライブラリは52歳白人女性の片側性副腎摘除術時に摘出された副腎腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は褐色細胞腫(クロム親和性細胞腫)を示した。患者の病歴には良性高血圧、腫瘍病、慢性副腎炎、特発性直腸結腸炎、白内障、および尿路感染症がある。以前の手術としては、膈式子宮摘出などがあった。患者の服用薬剤には、Procardia(1回服用のみ)およびProzac(5年)が含まれる。家族歴には、父親に2次のパーキンソン症候群があり、母親に脳血管疾患、2次のパーキンソン症候群、および不安があり、兄弟姉妹に良性高血圧症、アテローム硬化型冠動脈疾患、高脂血症、および脳瘍がある。
BRAFEN03	pINCY	この標準化胎児脳組織ライブラリは胎児脳組織ライブラリの326万の独立したクローンから作製した。RNA 源は妊娠23週目で左側発育不全心臓のため死産の白人男子胎児から採取した脳組織から作製した。このライブラリは、極めて長時間(48時間/1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回にわたり標準化した。
BRAFER05	pINCY	ライブラリは妊娠23週目で死産の左心低形成症胎児(白人男子胎児)から採取した脳組織から単離した RNA を用いて作製した。
BRAINOT09	pINCY	ライブラリは妊娠23週目で死亡の白人男子胎児から採取した脳組織から単離した RNA を用いて作製された。
COLHTUS02	pINCY	このサブライブラリは結腸腫瘍組織ライブラリは、上行横行結腸腫瘍ライブラリの404万のクローンと2回のサブライブラクションハイブリダイゼーションにかけられた、結腸腫瘍ライブラリの424万のクローンを用いて作製した。サブライブラクション開始ライブラリは、55才の白人男性の右結腸半側切除、付随的な虫垂切除、永久的な人工肛門形成時に、右結腸曲から採取した結腸腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学検査によると、上行結腸で周辺塊を形成する、末端切除端から10.5cm に位置する浸潤グレード3の腺癌であった。腫瘍が固有筋層を通過して結腸周囲脂肪組織に放射状脂肪縁の0.4cm内に浸潤した。患者の病歴には良性高血圧、不安、異常血液化学、眼瞼炎、心ブロック、骨粗鬆症、前立腺過形成があった。家族の病歴には前立腺癌、急性心筋梗塞、脳卒中、アテローム硬化型冠動脈疾患がある。サブライブラクション用ハイブリダイゼーションプロトコルは、同じ提供者からの非腫瘍性上行および横行結腸組織から単離された RNA を用いて同様に作製されたライブラリから得られた。サブライブラクションハイブリダイゼーションの条件は Swatrop 他, NAR 19 (1991):1954 および Bonaldo 他, Genome Research 6 (1996):791 の方法に基づいたものである。
EOSIHER02	PBLUESCRIPT	ライブラリは48才の白人男子からアフレキシニド投与された末梢血液細胞から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴には、過好酸球増加症がある。ライト染色によって細胞集団の77%以上が好酸球であることが判明した。
KIDCTME01	PCDNA2.1	この、5'に偏向してランダムプライムされたライブラリは65才男性の腎臓管切除時に摘出された腎臓皮質組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は切除辺縁部分には浸潤のないことを示した。一致する腫瘍組織の病理はグレード3の腎細胞

【表 6 - 2】

表6-2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
LUNGFET03 LUNGNON03	PINCY PSPORT1	ライブラリは妊娠 20 週で死亡した白人女子胎児から採取した肺組織から単離した RNA を用いて作製された。 この標準化したライブラリは、肺組織ライブラリの 256 万種の独立性子クローンから作製した。RNA は 58 才白人男性の部分的肺切除術時に左葉から摘出した肺組織から作製した。関連する腫瘍組織の病理は転移性グレード 3 (4 のうちの) の骨肉腫を示した。患者の病歴は、軟組織癌、二次性肺癌、前立腺癌および出血を伴う急性十二指腸潰瘍を含む。患者はまた、後腹膜腔に放射線療法を受けている。家族歴には前立腺癌、乳癌および急性白血球病がある。標準化およびハイブリダイゼーションの条件は Soares 他, PNAS (1994) 91:9228; Swarcop 他, NAR (1991) 19:1954; および Bonaldo 他, Genome Research (1996) 6:791 から採用了。
LUNGNON07	PINCY	この標準化した肺組織ライブラリは、或る肺組織ライブラリの 510 万種の独立性子クローンから作製した。開始 RNA の作製は、肺組織から単離した RNA から行った。このライブラリは、極めて長時間 (48 時間 / 1 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) 91:9228-9232 および Bonaldo 他, Genome Research (1996) 6:791 を適用した条件を用いて 2 回にわたり標準化した。
OVARDIR01	PCDNA2.1	このランダムプライムライブラリは 45 才の白人女性の腹式子宮全摘出、両側卵管卵巣摘出、陰嚢垂と固定化、および付随的虫垂切除時に除去された右卵巣組織から単離された RNA を用いて作製された。病理は、左右卵巣の間質性卵巣英膜癌腫を示した。一致する腫瘍組織の病理検査では、左の卵巣に顆粒細胞性奇形腫 (複数 (3) の壁内平滑筋腫が同定された。頸部は扁平上皮化生を示した。患者の病歴には、不正子宮出血、女性ストレス性失調症、脱毛症、抑鬱病、肺炎、正常分娩および欠乏性貧血が含まれる。家族歴には良性高血圧、アテローム硬化型冠動脈疾患、高脂血症および皮膚初感染徴候がある。
OVARTUT10	PINCY	ライブラリは腹式子宮全摘手術、孤立性卵巣の摘出および鼠径部ヘルニアの修復時に白人女性 (58 才) の左卵巣から摘出された卵巣腫瘍組織から単離された RNA を用いて作製した。病理は転移度 3 の結腸原発性腺癌で、左卵巣に部分的に嚢胞性、壊死性の腫瘍塊の形成および左卵巣間膜に結節形成がある大腸起源の腺癌を示した。単一壁内平滑筋腫が子宮筋層内に認められた。頸部は軽度の慢性嚢胞性子宮頸管炎を示した。患者の病歴には良性高血圧、卵巣の濾胞性嚢胞、結腸癌、良性の結腸新生物および骨関節症が含まれる。家族の病歴には肺炎腫、心筋梗塞、アテローム硬化型冠動脈疾患、良性高血圧および高脂血症がある。
PROSTUS20	PINCY	このサブトランクションされた前立腺腫瘍組織ライブラリは、PROSTUT13 ライブラリからの 236 万のクローンをを用いて作製し、FIBPN0701 からの 156 万のクローンと 2 回のサブトランクション/ハイブリダイゼーションにかけた。サブトランクション開始ライブラリは、59 才白人男性の高所のリンパ節切除を伴う前立腺全摘出時に摘除された前立腺腫瘍組織から単離された RNA を用い

表6-3

ライブラリ	バクター	ライブラリの説明
SINTNOR01	PCDNA2.1	このランダムプライムされたライブラリは、31才白人女性の Roux-Y 胃吻合術時に小腸組織から単離された RNA を用いて作製された。患者の病歴には臨床的肥満がある。
SPLNNOT09	PINCY	ライブラリは、22才白人男子(アシユクゲナージュ)の脾臓全摘時に摘除された罹患脾臓組織から単離された RNA を用いて作製された。病歴は著しい巨脾腫を伴うゴシエ病を示した。患者は血小板減少および脾臓の先天異常を示した。患者の病歴には甲状腺疾患と1型ゴシエ病が含まれる。患者の使用薬剤には Synthroid がある。家族歴には母親に良性高血圧、甲状腺疾患および甲状腺全摘があり、兄弟姉妹に甲状腺疾患、祖父母に良性高血圧、心筋梗塞、脳血管疾患、動脈硬化性心血管疾患および前立腺癌がある。
TESTNOT11	PINCY	ライブラリは絶死した16才の白人男子から採取した精巣組織から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴は薬物使用(タバコ、マリファナおよびコカイン)を含み、使用薬剤としてはリチウム、リタリンおよび Paxil 等があった。
THYRN03	PINCY	ライブラリは28才白人女性の甲状腺全摘術時に左甲状腺から取り除かれた甲状腺組織から単離した RNA を用いて作成した。病歴は左甲状腺に小结節の腺腫性過形成が見られた。関連腫瘍組織の病歴は、顕著な濾胞状腺腫を示しており、左甲状腺に被包性塊が形成されていた。
UTRSNON03	PINCY	このノーマライズされたライブラリは、UTRSNOT12 ライブラリからの640万の独立型クローンから作製した。RNA は、猿を伴う腫式子宮摘出術時に白人女性(41才)から摘除された子宮筋層組織から単離した RNA を用いて作製した。子宮内腺は分泌性であり、子宮内腺ポリープの断片が含まれていた。子宮頸管内に良性の頸管内外粘膜炎が確認された。関連する腫瘍組織の病理学検査では、子宮平滑筋腫が見られた。患者の病歴には腹部ヘルニアおよび良性の卵巣腫瘍がある。標準化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。
UTRSNOR01	PINCY	ライブラリは、腫式子宮摘出術および膀胱ヘルニアの修復時に白人女性(29才)から摘除された子宮筋層組織から単離した RNA を用いて作製した。病理検査は、子宮内腺が分泌性であること、限局性扁平上皮化生を伴う軽度の慢性子宮頸管炎を示した。随伴する腫瘍組織の病理学検査では、壁内子宮平滑筋腫が見られた。患者の病歴は、甲状腺機能低下症、骨盤底弛緩、対麻痺が含まれる。家族の病歴には、良性高血圧、II型糖尿病および高脂血症があった。
UTRSNOT02	PSF0RT1	ライブラリは34才の白人女性の腫式子宮摘出時に摘除された子宮組織から単離された RNA を用いて作製した。患者の病歴

【表 6 - 4】

表6-4

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明 には 備 註 井 障 害 が 含 ま れ る 。 家 族 歴 に は 胃 癌 、 先 天 性 心 臓 奇 形 、 過 敏 性 腸 症 候 群 、 潰 瘍 性 大 腸 炎 、 大 腸 癌 、 脳 血 管 疾 患 、 II 型 糖 尿 病 お よ び う 病 が あ る 。
-------	------	---

10

20

30

40

【 0 3 4 5 】

表7-1

プログラム	説明	参考文献	パラメータ閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して、あ いまいな塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder. アミノ酸配列または核酸配列の比 較および注釈付けに有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool. アミノ酸配列の よび核酸配列の配列類似性検索に有用である。 BLASTにはblastp, blastn, blastx, tblastnおよび tblastxの5つの機能がある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値1.0E-10 以下
FASTA	問合せ配列と同種の配列群との類似性を検索する Pearson およびLipman アルゴリズム。FASTAに は最少5つの機能(fasta, tfasta, fastx, tfastxおよび ssearch)がある。	Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W. R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; Smith, T. F. 及び M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E 値=1.0E-6 構築されたESTs: fasta 同一性= 95%以上 一致した長さ=200塩基以上 fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列: fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMお よびPFAM データベースの配列と対応させて選 択子ファミリー、配列相同性および構造的アインゲン ド領域を検索するBLOcks IMProved Searcher。	Henikoff, S. 及び J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. 及び S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; 及びAtwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値= 1.0E-3以下
HMMER	PFAMのようなタンパク質ファミリーコンセン サス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づい たデータベースに対して問合せ配列を検索する アルゴリズム。	Krogh, A. 他(1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Somnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, 1-350頁.	PFAM ヒット: 確率値= 1.0E-3 以下 シグナルペプチド ヒット: スコア= 0 以上

【表 7 - 2】

表7-2

【配列表】

2005528079000001.app

プログラム	説明	参考文献	パラメータ関値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列内の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	ノーマライズされた質スコアとその特定のProsite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ルングアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:176-185; Ewing, B. 及び P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づくプログラムであるSWATやCrossMatchを含むPhils Revised Assembly プログラムで、配列相同性の検索やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrapアセンブリの表示および編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンして、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) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重み行列を用いて蛋白配列での膜貫通セグメントを描写し配向を決定するプログラム。	Persson, B. 及び P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. 及び P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れMarkov モデル(HMM)を使ってタンパク質配列上の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow 他, eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ.	
Motifs	Prositeで定義された配列と一致したパターンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, 第9版, M61-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI	

10

20

30

40

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/07719
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 9/04; C12Q 1/32; A01N 37/18 US CL : 435/190, 26; 514/2 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. : 435/190, 26; 514/2 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) MEDLINE, AGRICOLA, BIOSIS, WPIDS, EAST, CAPLUS, GENBANK, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/31236 A2 (BOUGUELERET et al) 24 June 1999 (24.06.99), SEQ ID NO:443, relevant to parts d) and e) of claim 1.	1, 9, 17, 20
X, P	TrEMBL Accession Number Q96LJ2 (SUZUKI et al) 01 December 2001 (01.12.01), relevant to parts c)-e) of claim 1.	1
—		-----
Y, P		9, 17, 20
<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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier 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 17 October 2002 (17.10.2002)		Date of mailing of the international search report 28 MAR 2004
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 David J. Steadman <i>Janice Ford</i> Telephone No. (703) 308-0196 <i>for</i>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/07719

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.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 2, 9, 10, 17, 18, 20, and 56 and the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1

- 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/US02/07719

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

Group I, claims 1, 2, 9, 10, 17, 18, 20, and 56-78, drawn to a polypeptide comprising SEQ ID NO:1-23, a method of making a polypeptide, and a method of using a polypeptide to screen a compound as agonist.

Group II, claims 3-8, 12-16, 46-55, and 79-101, drawn to a polynucleotide encoding a polypeptide of SEQ ID NO:1-23, a polynucleotide comprising SEQ ID NO:24-46, a host cell, a transgenic organism, an array, a method for detecting a target polynucleotide by hybridization or PCR, and a method for generating an expression profile.

Group III, claims 11 and 30-43, drawn to an antibody that binds the polypeptide of SEQ ID NO:1-23, a method for making an antibody, a diagnostic test for a condition associated with the expression of SECP using an antibody, and a method of diagnosing a condition associated with expression of SECP.

Group IV, claim 19, drawn to a method for treating a disease associated with decreased expression of human secreted proteins (SECP) by administering a composition comprising SEQ ID NO:1-23.

Group V, claims 21 and 22, drawn to a composition comprising an agonist of SEQ ID NO:1-23 and a method for treating a disease associated with decreased expression of SECP by administering a composition comprising an agonist of SEQ ID NO:1-23.

Group VI, claim 23, drawn to a method of screening a compound as an antagonist of SEQ ID NO:1-23.

Group VII, claims 24 and 25, drawn to a composition comprising an antagonist of SEQ ID NO:1-23 and a method for treating a disease associated with overexpression of SECP by administering a composition comprising an antagonist of SEQ ID NO:1-23.

Group VIII, claims 26 and 27, drawn to a method for screening a compound that binds to or modulates SEQ ID NO:1-23.

Group IX, claim 28, drawn to a method of screening a compound for effectiveness in altering expression of SEQ ID NO:24-46.

Group X, claim 29, drawn to a method of assessing toxicity of a test compound using the polynucleotide of SEQ ID NO:24-46.

Group XI, claim 44 drawn to a method for detecting a polypeptide using an antibody that binds the polypeptide of SEQ ID NO:1-23

Group XII, claim 45, drawn to a method for purifying a polypeptide using an antibody that binds the polypeptide of SEQ ID NO:1-23

If applicant should elect the invention of Group I, III-VIII, XI, or XII, applicant should additionally elect one of the following inventions:

- Group A, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:1
- Group B, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:2
- Group C, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:3
- Group D, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:4
- Group E, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:5
- Group F, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:6
- Group G, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:7
- Group H, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:8
- Group I, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:9
- Group J, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:10
- Group K, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:11
- Group L, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:12
- Group M, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:13
- Group N, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:14
- Group O, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:15
- Group P, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:16
- Group Q, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:17
- Group R, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:18
- Group S, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:19
- Group T, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:20
- Group U, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:21
- Group V, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:22
- Group W, drawn to the polypeptide of SEQ ID NO:23

If applicant should elect the invention of Group II, IX, or X, applicant should additionally elect one of the following inventions:
Group X, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/07719

Group Y, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:25
Group Z, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:26
Group AA, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:27
Group AB, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:28
Group AC, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:29
Group AD, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:30
Group AE, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:31
Group AF, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:32
Group AG, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:33
Group AH, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:34
Group AI, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:35
Group AJ, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:36
Group AK, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:37
Group AL, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:38
Group AM, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:39
Group AN, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:40
Group AO, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:41
Group AP, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:42
Group AQ, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:43
Group AR, drawn to the polynucleotide of SEQ ID NO:44

The technical feature linking Groups I-XII and A-AR appears to be that they all relate to a polynucleotide encoding a secreted protein. The special technical feature of Groups I, III-VIII, XI, XII, and A-W is considered to be a polypeptide. The special technical feature of Group II, IX, X, and X-AR is considered to be a polynucleotide.

The inventions listed as Groups I-XII and A-AR do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical feature for the following reasons:

The polypeptides of Groups A-W are structurally and functionally distinct and therefore, share no special technical feature.

The polynucleotides of Groups X-AR are structurally distinct and encode functionally distinct polypeptides and therefore, share no special technical feature.

The polypeptide of Group I, the polynucleotide of Group II, and the antibody of Group III are structurally and chemically distinct entities capable of separate manufacture, use, and effect.

The methods of Groups IV-VIII, XI, and XII do not share any special technical feature with the polynucleotide of Group II.

The methods of Groups IX and X do not share any special technical feature with the polypeptide of Group I or the antibody of Group III.

The methods of Groups IV-VIII do not share any special technical feature with the antibody of Group III.

The methods of Groups IV-VIII, XI, and XII do not have unity of invention with the polypeptide of Group I as Group I already includes a method of use of the polypeptide which comprises unrelated steps to the methods of Groups IV-VIII, XI, and XII and 37 CFR 1.475 does not provide for the inclusion of multiple methods of use within the main invention.

The methods of Groups IX and X do not have unity of invention with the polynucleotide of Group II as Group II already includes a method of use of the polynucleotide which comprises unrelated steps to the methods of Groups IX and X and 37 CFR 1.475 does not provide for the inclusion of multiple methods of use within the main invention.

The methods of Groups XI and XII do not have unity of invention with the antibody of Group III as Group III already includes a method of use of the antibody which comprises unrelated steps to the methods of Groups XI and XII and 37 CFR 1.475 does not provide for the inclusion of multiple methods of use within the main invention.

Pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group I and SEQ ID NO:1) comprises the first-recited product, the polypeptide of SEQ ID NO:1, methods of making and use thereof. Further pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA considers that any feature which the subsequently recited methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such methods accordingly defines a separate invention.

In the absence of any response from the Applicant, this Authority will establish the International Preliminary Examination Report based on the main invention. The claims drawn to the main invention are as follows:

Claims: 1, 2, 9, 10, 17, 18, 20, and 56 and the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

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 1/04	4 B 0 6 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 1/18	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 5/14	
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 9/00	A 6 1 P 9/00	
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 9/12	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 9/14	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/08	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 13/00	A 6 1 P 11/08	
A 6 1 P 13/02	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/16	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 17/16	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/04	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/02	1 0 1
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/02	1 0 3
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/20	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 25/20	
A 6 1 P 27/06	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 27/12	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 27/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 29/00	1 0 1

A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/02	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	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/02	
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	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/50	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 60/280,596
 (32)優先日 平成13年3月30日(2001.3.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (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)
 (31)優先権主張番号 60/334,229
 (32)優先日 平成13年11月28日(2001.11.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/347,703
 (32)優先日 平成14年1月11日(2002.1.11)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 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95121・サンノゼ・ポルトンプレイスウェイ 3770
 (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94086・サニーバイル・#306・ブエナビスタアベニュー

2 4 3

- (72)発明者 ホンシェル、シンシア・ディー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 7 0 ・サンカルロス・# 2 0 3 ・ローレルストリート 4
0 0
- (72)発明者 リー、サリー
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・# 4 2 5 ・イーストイブリン 8
2 5
- (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 ギエツェン、キンバリー・ジェイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 3 ・サンノゼ・ロスウエコストドライブ 6 9 1
- (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 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 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 ガルラジャン、ラジャゴバル
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 8 ・サンノゼ・デントアベニュー 5 5 9 1
- (72)発明者 ラル、ブリーティ・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 ボーゲン、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 スー、ユーマー
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、ワイ・トム
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 アジムザイ、ヤルダ
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・ボールダーキャニオンドライブ
5 5 1 8
- (72)発明者 オウ・ヤング、ジャニス
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 0 5 ・プリズベン・ゴールデンイーグルレーン 2 3 3
- (72)発明者 カリック、デボラー・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 2 7 ・アサートン・リンダアベニュー 5 8
- (72)発明者 チョーラ、ナリンダー・ケイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ・ユニオンシティ・# 7 1 2 ・ユニオンスクエア 3
3
- (72)発明者 メイソン、パトリシア・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・マーブリースクエア 2 6 3 8

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37

FB02 FB03 FB15

4B024 AA01 AA11 BA31 BA44 BA80 CA01 GA11 HA12 HA15

4B029 AA23 BB20 CC03 FA15

4B063 QA05 QA19 QQ02 QQ42 QQ79 QQ96 QR32 QR48 QR55 QS33

QS34 QX01

4B064 AG01 AG27 AG31 CA19 CC24 DA01 DA08

4B065 AA93Y AB01 AC15 BA01 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 AA17 BA01 BA44 CA53 NA14 ZA022 ZA052
ZA062 ZA152 ZA162 ZA182 ZA202 ZA212 ZA222 ZA242 ZA332 ZA362
ZA392 ZA402 ZA422 ZA452 ZA512 ZA532 ZA542 ZA552 ZA592 ZA602
ZA612 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZA972 ZB072
ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB272 ZB332 ZB352 ZB372 ZC062 ZC212
ZC352
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB41 BB43 CC02 DD63 DD86 DD88
FF02 FF03 FF13 FF14 FF17 FF20
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA76 DA86 EA21 EA22 EA23 EA50
FA74

专利名称(译)	分泌蛋白质		
公开(公告)号	JP2005528079A	公开(公告)日	2005-09-22
申请号	JP2002570697	申请日	2002-03-05
[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 ヤングジュンミング エリオットビッキーエス ダガンプレンダンエム ホンシエルシンシアディー リーサリー サンガベルカピサ ギエツエンキンバリージェイ フォーサイスイアンジェイ リュデュングアイナエム グリフィンジェニファーエイ ガルラジャンラジャゴバル ラルプリーティジー ボーグンマライアアール スーユーミング タングワイトム アジムザイヤルダ オウヤングジャニス カリックデボラーエイ チョーラナリンダーケイ メイソンパトリシアエム トランユエンケイ		
发明人	ユエ、ヘンリー ヤング、ジュンミング エリオット、ビッキー・エス ダガン、ブレンダン・エム ホンシエル、シンシア・ディー リー、サリー サンガベル、カピサ ギエツエン、キンバリー・ジェイ フォーサイス、イアン・ジェイ リュ、デュング・アイナ・エム グリフィン、ジェニファー・エイ ガルラジャン、ラジャゴバル ラル、プリーティ・ジー ボーグン、マライア・アール スー、ユーミング タング、ワイトム アジムザイ、ヤルダ オウ・ヤング、ジャニス カリック、デボラー・エイ チョーラ、ナリンダー・ケイ メイソン、パトリシア・エム トラン、ユエン・ケイ		

IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/00 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/16 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N37/00
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/00 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/16 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C12N9/6421
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.B A61K39/395.J A61K45/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/00 A61P13/02 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/16 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/02.101 A61P25/02.103 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 C12N5/00.A A61K37/02
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA08 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC15 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA062 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA212 4C084/ZA222 4C084/ZA242 4C084/ZA332 4C084/ZA362 4C084/ZA392 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA532 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA602 4C084/ZA612 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/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB372 4C084/ZC062 4C084/ZC212 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/DD63 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF13 4C085/FF14 4C085/FF17 4C085/FF20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA50 4H045/FA74
优先权	60/273946 2001-03-06 US 60/276873 2001-03-16 US 60/280531 2001-03-30 US 60/280596 2001-03-30 US 60/332426 2001-11-16 US 60/334229 2001-11-28 US 60/347703 2002-01-11 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

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