

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8及び/又は配列番号10に記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド、

(ii) 生物学的に活性なポリペプチドとして機能する及び/又は上記(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を持つ、前記ポリペプチドのフラグメント、又は

(iii) 上記(i)又は(ii)と機能的に等価なポリペプチド。

【請求項2】

請求項1の項目(iii)に記載の機能的に等価なポリペプチドであって、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、及び/又は配列番号10に記載のアミノ酸配列と相同であり、かつC1q及び/又はコラーゲンドメイン含有ポリペプチドであることを特徴とするポリペプチド。

10

【請求項3】

配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、及び/又は配列番号10に記載のアミノ酸配列又はその活性フラグメントと、50%を越える配列同一性、好ましくは60%、70%、80%、90%、95%、98%又は99%を越える配列同一性を持つ、請求項1から2の何れか1項に記載の、フラグメント又は機能的に等価なポリペプチド。

【請求項4】

配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、及び/又は配列番号10に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチドと、有意な構造上の相同性を示す、請求項1から3の何れか1項に記載の、機能的に等価なポリペプチド。

20

【請求項5】

配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、及び/又は配列番号10の配列の7又はそれより多い(例えば8、10、12、14、16、18、20、またはそれ以上の)アミノ酸残基から成る、請求項1の項目(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を持つ、請求項1から4の何れか1項に記載の、フラグメント。

【請求項6】

請求項1から5のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項7】

前記ポリペプチドがヒスチジンタグを含む、請求項6に記載のポリペプチド。

30

【請求項8】

その配列が配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、及び/又は配列番号20に記載されてある、請求項7のポリペプチド。

【請求項9】

前記ポリペプチドがシグナルペプチドを含む、請求項1から8のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項10】

その配列が配列番号22、及び/又は配列番号24に記載されてある、請求項9のポリペプチド。

【請求項11】

請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドをコードする、精製された核酸分子。

40

【請求項12】

配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21及び/又は配列番号23に記載の核酸配列を含む、又は前記から成る、請求項11に記載の精製核酸分子。

【請求項13】

配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21及び/又は配列番号23に記載の核酸配列から成る、又はその重複等価配列又はそのフラグメントである、請求項11又は12に記載の精製核酸分子。

50

- 【請求項 1 4】
高いストリンジェンシー条件の下で、請求項11から13の何れか1項に記載の核酸分子とハイブリダイズする、精製核酸分子。
- 【請求項 1 5】
請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子を含む、ベクター。
- 【請求項 1 6】
請求項15に記載のベクターによって形質転換した、宿主細胞。
- 【請求項 1 7】
請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドと特異的に結合する、リガンド。
- 【請求項 1 8】 10
前記が抗体である、請求項17記載のリガンド。
- 【請求項 1 9】
請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドの発現又は活性レベルを、増加又は減少させる化合物。
- 【請求項 2 0】
請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドへ、該ポリペプチドのいずれの生物学的作用も誘発することなしに結合する、請求項19に記載の化合物。
- 【請求項 2 1】
天然の又は改変された基質、リガンド、酵素、レセプター又は構造的もしくは機能的模擬物質である、請求項20に記載の化合物。 20
- 【請求項 2 2】
疾患の治療又は診断において使用するための、請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチド、請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子、請求項15に記載のベクター、請求項16に記載の宿主細胞、請求項17又は18に記載のリガンド、又は請求項19から21の何れか1項に記載の化合物。
- 【請求項 2 3】
患者における疾患を診断する方法であって、前記方法が、前記患者由来の組織において、請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを評価するか、あるいは請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドの活性を評価する工程及び、前記発現又は活性のレベルを、コントロールのレベルと比較する工程を含み、前記コントロールレベルと相違するレベルは疾患の指標となる、前記疾患の診断方法 30
- 【請求項 2 4】
インビトロで行う、請求項23に記載の方法。
- 【請求項 2 5】
(a) 請求項17又は18に記載のリガンドを生物学的サンプルと、リガンド-ポリペプチド複合体を生成するのに適した条件下で接触させる工程、及び(b) 前記複合体を検出する工程を含む、請求項23又は24に記載の方法。
- 【請求項 2 6】
(i) 前記患者由来の組織のサンプルを、核酸プローブと、請求項11から14の何れか1項 40
に記載の核酸分子と前記プローブとの間でのハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で接触させる工程、
(ii) 上記工程a)において使用した条件と同じ条件下で、コントロールサンプルを前記プローブと接触させる工程、
(iii) 前記サンプルにおけるハイブリッド複合体の存在を検出する工程を含み、ここで、前記コントロールサンプルにおけるハイブリッド複合体レベルとは異なるハイブリッド複合体レベルが前記患者サンプルで検出されることが疾患の指標となる、請求項23又は24に記載の方法。
- 【請求項 2 7】
(i) 前記患者の組織由来の核酸サンプルを核酸プライマーと、請求項11から14の何れ 50

か1項に記載の核酸分子と前記プライマーとの間でのハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で接触させる工程、

(ii) コントロールサンプルを前記プライマーと、上記工程a)において使用した条件と同じ条件下で接触させる工程、

(iii) 前記サンプル核酸を増幅する工程、及び

(iv) 患者及びコントロールサンプルの両者に由来する増幅核酸のレベルを検出する工程を含み、ここでコントロールサンプルにおける増幅核酸レベルとは有意に異なる増幅核酸レベルが前記患者サンプルで検出されることが疾患の指標となる、請求項23又は24に記載の方法。

【請求項28】

(i) 疾患についてテストすべき患者由来の組織を得る工程、

(ii) 請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子を前記組織サンプルから単離する工程、及び

(iii) 前記疾患の指標として、前記疾患に関連する突然変異の存在を前記核酸分子で検出することにより、疾患について前記患者を診断する工程を含む、請求項23又は24に記載の方法。

【請求項29】

更に、前記核酸分子を増幅して、増幅生成物を生成する工程、及び前記増幅生成物で突然変異の有無を検出する工程を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記患者における前記突然変異の有無が、前記核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブと前記核酸分子とを、ストリンジェントな条件下で接触させて、ハイブリッド二本鎖分子を生成する工程であって、ここで前記ハイブリッド二本鎖分子は、疾患と関連する突然変異に対応する任意の部分において、前記核酸プローブ鎖の未ハイブリダイズ部分を有する、前記工程；及び前記疾患関連突然変異の有無の指標として、前記プローブ鎖の未ハイブリダイズ部分の有無を検出する工程によって検出される、請求項28又は29に記載の方法。

【請求項31】

前記疾患が、自己免疫疾患、自己免疫内耳疾患、迷路炎、メニエール病及びメニエール症候群、外リンパ又は迷路フィステル、耳鳴、神経変性疾患、アミロイド症、アルツハイマー病、パーキンソン病、家族性痴呆、炎症、微生物感染、細菌感染、ウイルス感染(HIV、HTLV又はMuLV感染)、寄生虫感染、SLE、糸球体腎炎、肥満、糖尿病、シュミット骨端線軟骨形成不全、角膜内皮異栄養症、後部多形性角膜異栄養症(PCPD)、フック内皮角膜異栄養症(FECD)、アテローム性硬化症、壊血病、癌、胃腸管支質腫瘍、骨肉腫、軟骨芽細胞腫、巨細胞腫瘍、脊椎骨端線形成不全日本人型(SMD)、骨形成不全、エーレルス-ダンロー症候群、頸部動脈切開に対する感受性、エーレルス-ダンロー症候群、大動脈動脈瘤、耳脊椎巨大骨端形成不全、聴力消失(聾)、バイセンバツハー-ツヴァイミュラー症候群、関節炎、骨若しくは骨格の疾患、晩発性網膜変性(L-ORD)、年齢性黄斑変性(AMD)及び/又は失明である、請求項23から30の何れか1項に記載の方法。

【請求項32】

前記疾患が、C1qドメイン及び/又はコラーゲンドメイン含有タンパク質が関与している疾患である、請求項23から30の何れか1項に記載の方法。

【請求項33】

請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドの、C1qドメイン及び/又はコラーゲンドメイン含有タンパク質としての使用。

【請求項34】

請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチド、請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子、請求項15に記載のベクター、請求項16に記載の宿主細胞、請求項17又は18に記載のリガンド又は請求項19から21の何れか1項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項35】

10

20

30

40

50

請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチド又は請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子を含む、ワクチン組成物。

【請求項36】

自己免疫疾患、自己免疫内耳疾患、迷路炎、メニエール病及びメニエール症候群、外リンパ又は迷路フィステル、耳鳴、神経変性疾患、アミロイド症、アルツハイマー病、パーキンソン病、家族性痴呆、炎症、微生物感染、細菌感染、ウイルス感染（HIV、HTLV又はMuLV感染）、寄生虫感染、SLE、糸球体腎炎、肥満、糖尿病、シュミット骨端線軟骨形成不全、角膜内皮異栄養症、後部多形性角膜異栄養症（PPCD）、フック内皮角膜異栄養症（FEC）、アテローム性硬化症、壊血病、癌、胃腸管支質腫瘍、骨肉腫、軟骨芽細胞腫、巨細胞腫瘍、脊椎骨端線形成不全日本人型（SMD）、骨形成不全、エーレルス-ダンロー症候群、頸部動脈切開に対する感受性、エーレルス-ダンロー症候群、大動脈動脈瘤、耳脊椎巨大骨端形成不全、聴力消失（聾）、バイセンバツハー-ツヴァイミュラー症候群、関節炎、骨若しくは骨格の疾患、晩発性網膜変性（L-ORD）、年齢性黄斑変性（AMD）及び/又は失明の治療を目的とする医薬の製造で使用する、請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチド、請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子、請求項15に記載のベクター、請求項16に記載の宿主細胞、請求項17又は18に記載のリガンド、又は請求項19から21の何れか1項に記載の化合物、又は請求項34に記載の医薬組成物。

10

【請求項37】

C1qドメイン及び/又はコラーゲンドメイン含有タンパク質が関与する疾患の治療を目的とする医薬の製造で使用する、請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチド、請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子、請求項15に記載のベクター、請求項16に記載の宿主細胞、請求項17又は18に記載のリガンド、請求項19から21の何れか1項に記載の化合物、又は請求項34に記載の医薬組成物。

20

【請求項38】

患者で疾患を治療する方法であって、前記患者に、請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチド、請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子、請求項15に記載のベクター、請求項16に記載の宿主細胞、請求項17又は18に記載のリガンド、請求項19から21の何れか1項に記載の化合物、又は請求項34に記載の医薬組成物を投与することを含む、前記疾患の治療方法。

【請求項39】

前記ポリペプチドの天然の遺伝子の発現又は前記ポリペプチドの活性が、健康な患者での発現又は活性のレベルと比較したとき、疾患をもつ患者で低くなる疾患に対して前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物又は組成物がアゴニストである、請求項38に記載の方法。

30

【請求項40】

前記ポリペプチドの天然の遺伝子の発現又は前記ポリペプチドの活性が、健康な患者での発現又は活性のレベルと比較したとき、疾患をもつ患者で高くなる疾患に対して前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物又は組成物がアンタゴニストである、請求項38に記載の方法。

【請求項41】

患者で疾患の治療措置をモニターする方法であって、前記患者由来の組織における、請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドの発現又は活性レベル、又は請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子の発現レベルを、所定期間にわたってモニターする工程を含み、ここで前記発現又は活性レベルが、前記所定期間にわたってコントロールレベルに対して変化することが、前記疾患の後退を表す指標である、前記治療措置をモニターする方法。

40

【請求項42】

疾患の治療及び/又は診断において有効な化合物を同定する方法であって、請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチド、又は請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子を、前記ポリペプチド又は核酸分子に対して結合親和性を有すると思われる、1種又はそ

50

れ以上の化合物とを接触させる工程、及び前記核酸分子又はポリペプチドと特異的に結合する化合物を選別する工程を含む、前記有効な化合物の同定方法。

【請求項 4 3】

疾患の診断に有用なキットであって、前記キットが、ストリンジェント条件下で、請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子とハイブリッドを形成する核酸プローブを含む第一の容器；前記核酸分子の増幅に有用なプライマーを含む第二の容器；及び該疾患の診断を容易にするために前記プローブ及びプライマーを使用することについての指示を含む、前記診断に有用なキット。

【請求項 4 4】

更に、ハイブリダイズしていないRNAを消化するための薬剤を納めた第三の容器を含む、請求項43に記載のキット。

10

【請求項 4 5】

核酸分子のアレイを含み、その少なくとも一つが、請求項11から14の何れか1項に記載の核酸分子であるキット。

【請求項 4 6】

請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドと結合する、1種又はそれ以上の抗体、及び前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応の検出に有用な試薬を含むキット。

【請求項 4 7】

請求項1から10の何れか1項に記載のポリペプチドの発現レベルを高めるか、低下させるか、又はこれを発現しないように形質転換されている、トランスジェニック又はノックアウト非-ヒト動物。

20

【請求項 4 8】

請求項47に記載の非-ヒトトランスジェニック動物を、候補化合物と接触させ、かつ前記動物の疾患に及ぼす前記化合物の作用を測定することによって、疾患の治療に有効な化合物をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は、ここにおいて、分泌タンパク質として、特にc1qドメイン含有タンパク質として同定された、INSP161と呼ばれる新規なタンパク質、並びに疾患の診断、予防及び治療におけるこのタンパク質及びコード遺伝子由来の核酸配列の使用に関連する。

30

ここに引用する全ての刊行物、特許及び特許出願は、その全体をここに参考文献として組み入れる。

【0002】

[背景技術]

機能ゲノム学の時代が、機を熟したことから、薬物発見のプロセスは、現在根本的な変革期にある。「機能ゲノム学(functional genomics)」なる用語は、対象とするタンパク質配列に機能を帰属させるためのバイオインフォマティクス手段を利用する方法に適用される。配列データ発生速度が、研究室の、これらタンパク質配列に機能を帰属させる能力を、凌駕していることから、このような手段が、益々必要となってきた。

40

バイオインフォマティクス手段の能力及び精度が高まるにつれて、これらの手段は、迅速に、生化学的な特徴付けに関する従来技術に取って代りつつある。事実、本発明を同定するに際して使用している、最新のバイオインフォマティクス手段は、高度に信頼することのできる、結果を出すことを可能とする。

様々な機関及び工業的な組織体が、配列データを検討している。というのは、これらが利用可能であり、しかも多大な発見が、継続的になされているからである。しかしながら、更なる遺伝子及びこれらがコードするポリペプチドを、研究の目的及び薬物発見の目的で同定し、かつ特徴付けするための、絶え間ない需要が存在する。

【0003】

50

緒言分泌タンパク質

細胞外タンパク質を製造し、また分泌する細胞の能力は、多くの生物学的な過程にとって中心となるものである。酵素、成長因子、細胞外マトリックスタンパク質及びシグナル発生分子は、全て細胞によって分泌される。これは、分泌小胞と細胞膜との融合を通して行われる。全ての場合ではないが、多くの場合において、タンパク質は小胞体に導かれ、シグナルペプチドによって分泌小胞に送られる。シグナルペプチドは、細胞質から膜結合区画、例えば分泌小胞までの、ポリペプチド鎖の輸送に影響を与える、シス作用配列である。分泌小胞に送られるポリペプチドは、細胞外マトリックスに分泌されるか、あるいは細胞膜内に保持される。細胞膜内に保持される該ポリペプチドは、1又はそれ以上の貫膜ドメインを持つであろう。細胞の機能発揮において中心的な役割を演じる、分泌タンパク質の例は、サイトカイン、ホルモン、細胞外マトリックスタンパク質(接着性分子)、プロテアーゼ、及び成長並びに分化因子である。これらタンパク質の特性に関する幾つかの説明は、以下の通りである。

10

【0004】

C1qタンパク質

c1qファミリーのタンパク質は、球状トリマーC-末端ドメイン(gC1qとして知られている)を特徴とする。結晶学的研究によって、TNF及びマウスACRP30の球状c1qドメインは、近縁な三次構造及びトリマー編成を有することが明らかになり、進化における連関が示唆された。もっともよく知られている前記ファミリーのメンバーはc1q自体であり、c1qは18本の鎖を含むブーケ様分子である。c1qは免疫複合体を認識することが示され、古典的補体経路を活性化することが分かっている(Kishore & Reid, 2000, Immunopharmacology 49:159-170)。

20

c1qは、血清補体系を活性化するC1酵素複合体のサブユニットである。前記は、A、BおよびC鎖(N-末端の非ヘリックス領域から成る共通構造を共有する)を有する9ジスルフィド結合ダイマー、三重ヘリックス(コラーゲン性)領域、およびc1qドメインと呼ばれるC-末端球状頭部を含む(Smith et al. Biochem. J. 1994. 301:249-256)。c1qおよびTNFのスーパーファミリーのメンバーは、宿主の防御、炎症、アポトーシス、自己免疫、細胞分化、器官形成、冬眠及びインスリン耐性肥満に必要とされる。5つの厳密に保存された残基がc1qファミリーで同定された(Kishore et al. Trends in Immunology 2004. 25(10):551-561)。c1qドメインの各々は、2つの5本鎖シート[(A', A, H, C, F)および(B', B, G, D, E)](各々はアンチパラレル鎖から構成される)から成る、ゼリーロールの局所構造を有する10鎖サンドイッチの折りたたみを見せている。鎖は、鎖を連結するループとは対照的に(ループは顕著な変動性を示す)、種々のc1qドメインで強力に(向きおよびサイズと比較して)保存されている。c1qドメイン内には良好に保存されているドメインが存在する。すなわち、芳香族モチーフはドメインの最初の半分内に位置し、他方の保存領域はC-末端の先端近くに位置する。

30

c1qおよびTNFファミリータンパク質は類似する遺伝子構造を有する。それらのc1qまたはTHDドメインは各々1つのエクソン内でコードされ、一方、両ファミリーのイントロンはそれぞれのN-末端のコラーゲンまたは茎状部領域に限定される。ゼリーロール構造は植物ウイルスおよび哺乳類のピコルナウイルス(口蹄疫ウイルスおよびポリオウイルスを含む)のキャプシドタンパク質と極めて類似する。

40

【0005】

c1q含有タンパク質には以下が含まれる：

- 補体c1qのサブ成分A、B及びC鎖。効率的なC1の活性化は、c1qの球状頭部と免疫複合体に存在するIgGまたはIgMのFc領域との相互作用により生じる。
- 脊椎動物の短鎖コラーゲンVIII型、角膜内皮細胞の基底膜の主要な成分。c1qドメインを含む短いN-末端およびより大きなC-末端小球体間に存在する三重ヘリックスドメインを含む。
- 脊椎動物のコラーゲンX型(コラーゲンVIII型と同じ構造を有する)。前記は肥厚性軟

50

骨細胞 (chondrocyte) の生成物である。

- ブルーギル内耳特異的構造タンパク質。この短鎖コラーゲンは、平衡砂膜内の微小構造マトリックスを形成する。

- シマリスの冬眠関連血漿タンパク質HP-20、HP-25およびHP-27。これらのタンパク質は冬眠中に特異的に血中から消失する。前記タンパク質はN-末端及びC-末端のc1qドメイン近くにコラーゲン様ドメインを含む。

- ヒトのプレセレリン、前記はプルキンエ細胞のシナプス後構造内に位置し、おそらく膜に結合している。セレベリンはシナプスの活動に必要とされる。

- ラットのプレセレリン様糖タンパク質、おそらくは膜タンパク質。c1qドメインはC-末端の細胞外先端に位置する。

10

- ヒト内皮細胞マルチメリン (ECM)、血小板因子V/VAのための担体タンパク質。

- 脊椎動物の30kD脂肪細胞補体関連タンパク質 (ACRP30) (ApM1またはアジポQとしても知られている)。

C1qは、古典的経路によって駆動される先天的な免疫とIgGまたはIgM仲介後天的免疫との間の連関を示す (c1qおよび腫瘍壊死因子スーパーファミリーは以下の文献で概説されている: Kishore et al. Trends in Immunology 2004. 25(10):551-561)。IgGまたはIgM含有免疫複合体はc1qドメインと結合し、コラーゲン領域内に配座性変化を引き起こす。c1qは、抗菌防御、アポトーシス細胞の除去を介しての免疫寛容の維持、食菌作用、レトロウイルスの中和、細胞接着、並びに、多量のリガンド [例えばある種のレトロウイルスのエンベロープタンパク質、アミロイド原線維、リポ多糖類 (LPS)、グラム陰性細菌由来のポリリン、リン脂質 (PL) アポトーシス細胞及びいくつかの急性期反応物 (ペントラキシンを含む)] の作用を介する樹状突起細胞 (DC)、B細胞および線維芽細胞の調節において必要とされる (Kishore et al.)。ほとんど全てのリガンドがヘテロトリマーc1qドメイン (長さが約140残基) によって認識される。

20

【0006】

c1qドメインは以下を含むその他の種々のタンパク質と相互作用する:

- C-反応性タンパク質 (CRP) (主要な急性期反応物)。CRPはクロマチンと結合し、壊死細胞由来の染色体性物質の除去に主要な役割を有する可能性がある。

- SAP、前記は補体の活性化をもたらす。

- PTX3、前記はアポトーシス細胞上での補体の活性化を仲介する。

30

- デコリン、前記は組織中での古典的経路の活性化を調節する。

- 脂質A、LPSおよびポリリンを介するグラム陰性細菌のタンパク質。Ompk36 (肺炎桿菌 (Klebsiella pneumoniae) 由来) はc1qとの結合についてIgGと直接的に競合する。

- ウイルスタンパク質 (エンベロープをもつもの及びもたないもの)、例えばHIV-1のエンベロープタンパク質gp41、HTLV-1のgp21、及びMuLVのp15e。c1qドメインのウイルスとの結合はウイルスの中和をもたらす可能性がある。しかしながら、c1q-gp41相互作用は、ウイルスの溶解の代わりに補体 レセプター 保持細胞の感染の増強をもたらす。HTLV-1ペプチドとc1qドメインとの間の相互作用は、合胞体形成に必要な融合プロセスに影響を与える可能性がある。

- アポトーシス細胞上のペントラキシン。c1q欠損は、アポトーシス細胞除去の障害の結果としてSLEを引き起こしえる。アポトーシスケラチノサイトの表面の小水胞および末梢血単核球 (これらは自己抗原を含んでいる) はSLEで標的とされる。c1qノックアウトマウス (免疫沈着物による糸球体腎炎を有する) では、多数のアポトーシス体がまた病変をもつ糸球体に存在する。c1qはまたアポトーシス細胞の効率的な認識及び生理学的な除去においてオプソニンとして機能することによって自己免疫を防御し、したがって免疫寛容の維持に必要とされる可能性がある。

40

- アミロイド及び家族性痴呆ペプチド (N-末端領域)。古典的経路の活性化は神経炎症局面の炎症をもたらす。

- カルジオリピン及び他の陰イオン性PL、アポトーシス細胞及び壊死細胞の除去における可能な役割が示唆される。

50

【0007】

c1qサブ成分のC-末端球状ドメイン並びにコラーゲンVIII型及びX型は、三重ヘリックスの正確な折りたたみとアラインメントのため及びタンパク質-タンパク質認識事象のために重要である。コラーゲンX型については、前記ドメインは、正確なタンパク質のアッセムブリの開始及び維持のために重要であるといわれている (Kwan et al. J. Cell Biol. 1991 114:597-604)。アジポネクチンの場合、c1qドメインは、完全長のアジポネクチンよりもはるかに強力に高血糖症および高インスリン血症を緩和することができる。アジポネクチンは、成熟マクロファージの機能をそれらの食作用活性及びLPS誘発TNF- α 産生を阻害することによって抑制し、したがって炎症を消散させることが示された。アジポネクチンはまた、肥満マウスの筋肉内及び肝臓内のトリグリセリド含有量を減少させることによって肥満に付随するインスリン耐性を復帰させることが示された。アジポネクチンの減少は、肥満及び2型糖尿病のマウスモデルにおけるインスリン耐性の発生に関係している。成長板異常 (“シュミット骨端線軟骨形成不全”と称される)に付随する軽度の常染色体障害は、コラーゲンX型のc1qドメインにおけるミスセンス変異に付随している (前記変異は疎水性コアを破壊しトリマーのアッセムブリを混乱させる)。CTRP5のC1qドメインにおける特異的な変異は晩発性網膜変性に付随している。

10

【0008】

c1qファミリーはまた、いくつかのコラーゲン形成性メンバー (例えばCRF、ACRP30並びにコラーゲンVII型及びX型) 及び2つの非コラーゲン形成性メンバー (プレセレリン及びマルチメリン) を含む。これらのタンパク質は種々の器官で細胞外マトリックスの部分を形成する。ACRP30は、インスリンに応答し脂肪組織によって合成される豊富な血清蛋白質であり、肥満マウスおよびヒトでダウンレギュレートされる。このことは、エネルギー代謝における役割を示唆している (Bodmer et al. 2002. Trends in Biochem. Sci. 27(1):19-26)。

20

コラーゲンドメインは、結合組織構造の形成に必要な一般的には細胞外構造タンパク質であるコラーゲンで見出される。前記ドメインは、三重ヘリックスを形成する20コピーのG-X-Yリピートを含む。前記リピートの最初の位置はグリシンであり、第二及び第三の位置は任意の残基であるがしばしばプロリン及びヒドロキシプロリンである。コラーゲンは翻訳後にプロリンヒドロキシラーゼによって修飾されヒドロキシプロリン残基を形成する。不完全なヒドロキシル化は壊血病の原因である。コラーゲンスーパーファミリーのいくつかのメンバーは結合組織構造に必要ではないが、同じ三重ヘリックス構造を共有する。ヒト線維芽細胞に対するc1qの抗増殖性 (G1期有糸分裂停止) 及び前アポトーシス作用は、カルレチクリン-CD91複合体を通じて前記コラーゲン領域によって仲介される。この相互作用は、p38 MAPKの活性化、NF- κ B活性、並びにマクロファージにおける前炎症性サイトカイン及びケモカインの産生を高める。

30

C1qドメイン含有タンパク質の活性の改変はしたがって疾患の表現型を変化させる手段を提供し、したがって、このタイプの新規なタンパク質の同定は、それらが上記で特定した疾患と同様に他の症状についても治療の開発に役割を果たすか又は有用でありえるので極めて適切である。

【0009】

発明の要旨

本発明は、INSP161ポリペプチドは分泌タンパク質であり、特にc1qドメイン含有タンパク質であるという発見に基づくものである。

本発明の第一の局面に係る一態様では、以下のようなポリペプチドが提供される：

- (i) 配列番号2、配列番号4、配列番号8及び/又は配列番号10に記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド；
- (ii) 生物学的に活性なポリペプチドとして機能し、及び/又は上記(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を持つ、前記ポリペプチドのフラグメント、又は
- (iii) 上記(i)又は(ii)と機能的に等価なものとしてのポリペプチド。

配列番号2に記載の配列を有するポリペプチドは、以下では“INSP161成熟ポリペプチド

40

50

”と称される。配列番号4に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP161-Aポリペプチド”と称される。配列番号6に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP161-Bポリペプチド”と称される。配列番号8に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP161-Cポリペプチド”と称される。配列番号10に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“c1qポリペプチド”と称される。配列番号12に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ヒスチジントグINSP161成熟ポリペプチド”と称される。配列番号14に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ヒスチジントグINSP161-Aポリペプチド”と称される。配列番号16に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ヒスチジントグINSP161-Bポリペプチド”と称される。配列番号18に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ヒスチジントグINSP161-Cポリペプチド”と称される。配列番号20に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ヒスチジントグc1qポリペプチド”と称される。

10

【0010】

本発明の第一の局面のポリペプチドはさらにヒスチジントグを含む。好ましくは、前記ヒスチジントグはポリペプチドのC-末端に見出される。好ましくは、前記ヒスチジントグは1-10のヒスチジン残基（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10残基）を含む。より好ましくは、前記ヒスチジントグは6個のヒスチジン残基を含む。好ましいポリペプチドはしたがって、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18及び/又は配列番号20に記載の配列を含むポリペプチドである。好ましくは、前記ポリペプチドは、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18及び/又は配列番号20に記載の配列から成る。

本出願人はこの理論に拘束されることを望まないが、INSP161成熟ポリペプチド及びヒスチジントグINSP161成熟ポリペプチド（それぞれ配列番号2及び12）はさらにそのN-末端に長さが37アミノ酸のシグナルペプチドを含むと仮定する。

20

この仮定シグナル配列を有するINSP161成熟ポリペプチド配列は配列番号22に記載されている。この仮定シグナル配列を有するヒスチジントグINSP161成熟ポリペプチド配列は配列番号24に記載されている。

配列番号22に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP161ポリペプチド”と称される。配列番号24に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“ヒスチジントグINSP161ポリペプチド”と称される。

【0011】

本明細書で用いられる“INSP161ポリペプチド”という用語には、INSP161成熟ポリペプチド、INSP161-Aポリペプチド、INSP161-Bポリペプチド、INSP161-Cポリペプチド、c1qポリペプチド、ヒスチジントグINSP161成熟ポリペプチド、ヒスチジントグINSP161-Aポリペプチド、ヒスチジントグINSP161-B成熟ポリペプチド、ヒスチジントグINSP161-Cポリペプチド、ヒスチジントグc1qポリペプチド、INSP161ポリペプチド及びヒスチジントグINSP161ポリペプチドを構成するポリペプチドが含まれる。

30

好ましくは、本発明の上述の局面のいずれかに記載のポリペプチドはc1qドメイン含有タンパク質及び/又はコラーゲンドメイン含有タンパク質として機能する。

“c1qドメイン含有タンパク質として機能する”とは、c1qドメイン含有タンパク質ファミリーのポリペプチド内で保存されている特性として特定することができるアミノ酸配列又は構造的特性を含むポリペプチドを指す。特に、前記ポリペプチド内の特定の位置にジスルフィド結合の形成を可能にするシステイン残基が存在することを意味する。C1q自体と同様に、INSP161ポリペプチドは免疫機能をもつことができる。前記ポリペプチドはまた細胞外マトリックスの部分として機能しえる。前記タンパク質はまた骨又は軟骨形成において機能し、さらにエネルギー代謝を修復またはエネルギー代謝で役割を果たすことができる。

40

“コラーゲンドメイン含有タンパク質として機能する”とは、コラーゲンドメイン含有タンパク質ファミリーのポリペプチド内で保存されている特性として特定することができるアミノ酸配列又は構造的特性を含むポリペプチドを指す。特に、前記ポリペプチド内の特定の位置にジスルフィド結合の形成を可能にするシステイン残基が存在することを意味する。

50

【 0 0 1 2 】

INSP161は、内耳特異的構造タンパク質 (SwissProt Acc. Code:COLE_LEPMA; Davis et al. 1995. Science 267:1031-1034)、魚類の平衡砂中のオトリン-1 (SwissProt Acc. Code:OT01_ONCKE; Murayama et al. 2002. Eur. J. Biochem 269:688-696)、ヒトアルファ 1 及びアルファ 2 (VIII) 鎖 (COL8A1, SwissProt Acc. Code:CA18_HUMAN及びCOL8A2, SwissProt Acc. Code:CA28_HUMAN; Muragaki et al. 1991. Eur. J. Biochem 197:615-622; Ota et al. 2004. Nat. Genet. 36:40-45)、コラーゲンアルファ 1 (X) 鎖前駆体 (COL10A1, SwissProt Acc. Code: CA1A_HUMAN; Thomas et al. 1991. Biochem. J. 280:617-623)、アジポネクチン (SwissProt Acc. Code:APM1_HUMAN)、補体c1q腫瘍壊死因子関連タンパク質 3 (CORS26; SwissProt Acc. Code:CQT3_HUMAN)、補体c1q腫瘍因子関連タンパク質 5 (UNQ303; SwissProt Acc. Code: CQT5_HUMAN)、及びヒトミトコンドリア熱タンパク質 (W003/087768) と構造的 (図 7) 及びアミノ酸レベル (図 1) の両方で関連を有することが示された。

10

内耳特異的構造タンパク質は、おそらく嚢状上皮の外側周縁に存在する特殊化された分泌性支持細胞の平衡砂膜内の微小構造マトリックスを形成する。オトリン-1は平衡砂の内部構造の部分である可能性があり、そこでオトリン-1は核形成部位を提供し石灰化を促進することができる (石灰化は選択的に球形嚢で発現し、平衡砂、平衡砂膜のゼラチン層及び移行上皮の一部に局在する)。COL8A1及びCOL8A2は、角膜内皮細胞のデスメ膜 (基底膜) の主要成分で、ホモトリマー又はヘテロトリマー結合物 (マウスの肺及び乳房腫瘍での組織発現物) を一緒に形成する。COL8A2のミスセンス変異は角膜内皮異栄養症の2つの形態を生じる (Biswas et al. 2001. Hum. Mol. Genet. 10:2415-2423)。COL8A2の欠損は後部多形角膜異栄養症 (posterior polymorphous corneal dystrophy; PPCD) の原因である。PPCDは、通常は成人の様々な程度の視覚障害をもたらす緩徐に進行する角膜内皮の遺伝性障害である。PPCDは通常は常染色体の優性形質として遺伝する。COL8A2の欠損はまたフック (Fuchs) 角膜内皮変性 (FECV) の原因である。FECVは、先進国のもっとも一般的な原発性角膜内皮異常である。痛みを伴う視力低下の症状は角膜代償機能不全から生じる。徴候は40歳台から先で存在しえる。典型的には、デスメ膜から生じる中心をもつ (focal) 疣贅様滴が角膜中心で発生する。デスメ膜は、異常なコラーゲン性沈着物によって肥厚する。FECVは通常は散発性であるが、常染色体優性遺伝を示す、家族性の高い浸透度をもつ形態もまた認められている。さらにまたVIII型コラーゲンの発現上昇がアポE-欠損マウスのアテローム性硬化症斑で見出され、アテローム性硬化症におけるCOL8A鎖の役割が示唆されている (Yasuda et al. 2001 Ann N Y Acad Sci. 947:312-5)。COL8A1の過剰発現が胃腸管の支質腫瘍で検出された (Gut et al. 2004 53(2):235-40)。X型コラーゲン (ホモトリマーサブユニット) は肥大性軟骨細胞の生成物であり、ヒアリン軟骨の仮定的鉱化帯に分布していた。COL10A1の欠損はシュミット骨端線軟骨形成不全 (SMCD) の原因である (Wallis et al. 1994. Am. J. Hum. Genet. 54:169-178)。SMCDは、骨骨格の優性遺伝疾患である。前記表現型の重要な特徴は軽度の短身長、コアクスバラ (coax var a) 及び左右にゆれる歩行である。X線撮影法では通常、肋骨部の硬化症、骨端線の発赤拡大及び広く不規則な成長板 (特に膝) が示される。COL10A1の欠損はまた、脊椎骨端線形成不全日本人型 (SMD) の原因である。SMDは、脊椎椎体及び管状骨の骨端線の修飾を特徴とする、不均一な一群の遺伝性骨格形成不全を含む。アジポネクチン (ACDC遺伝子) は、造血作用及び免疫系における重要な負の調節物質である。前記はその阻害性機能により炎症性反応を終了させる際に必要かもしれない。前記は、cAMP依存経路を介して内皮のNF- κ Bシグナリングを内皮接着分子のTNF- α 誘導発現と同様に阻害する。アジポネクチンは脂肪代謝及びインスリン感受性の制御に必要とされる。前記はもっぱら脂肪細胞によって合成され、血漿中に分泌される。ACDCの欠損はアジポネクチン欠乏症の原因である。その結果は非常に低濃度の血中アジポネクチンである。アジポネクチンの血中レベルの低下は肥満インスリン耐性及び2型糖尿病を伴う。CORS-26は、関節炎、骨若しくは骨格の疾患、骨肉種、軟骨芽細胞腫及び巨細胞腫瘍に密接に関連する可能性がある (Schaffler et al. 2003 Biochim Biophys Acta. 1628(1):64-70; Biochim Biophys Acta 2003

20

30

40

50

1630(2-3):123-9)。補体c1q腫瘍壊死因子関連タンパク質5のc1qドメインにおける変異は晩発性網膜変性(L-ORD)、年齢性黄斑変性(AMD)及び/又は失明をもたらす(Hayward et al. 2003 Hum Mol Genet. 12(20):2657-67)。W003/087768は、ミトコンドリア機能の変化に付随する疾患の処置において治療的介入として用いることができるミトコンドリア標的(ヒトミトコンドリア熱タンパク質を含む)について考察している。

【0013】

第二の局面において、本発明は、本発明の第一の局面によるポリペプチドをコードする、精製された核酸分子を提供する。

好ましくは、この精製された核酸分子は、配列番号1(INSP161成熟ポリペプチドをコードする)、配列番号3(INSP161-Aポリペプチドをコードする)、配列番号5(INSP161-Bポリペプチドをコードする)、配列番号7(INSP161-Cポリペプチドをコードする)、配列番号9(C1qポリペプチドをコードする)、配列番号11(ヒスチジントグ INSP161成熟ポリペプチドをコードする)、配列番号13(ヒスチジントグ INSP161-Aポリペプチドをコードする)、配列番号15(ヒスチジントグ INSP161-Bポリペプチドをコードする)、配列番号17(ヒスチジントグ INSP161-Cポリペプチドをコードする)、配列番号19(ヒスチジントグ C1qポリペプチドをコードする)、配列番号21(INSP161ポリペプチドをコードする)及び/又は配列番号23(ヒスチジン INSP161ポリペプチドをコードする)に記載の核酸配列を含むものであるか、あるいはこれら配列の何れか一つの重複等価配列(redundant equivalent)又はそのフラグメントである。

本発明は、更に配列番号1(INSP161成熟ポリペプチドをコードする)、配列番号3(INSP161-Aポリペプチドをコードする)、配列番号5(INSP161-Bポリペプチドをコードする)、配列番号7(INSP161-Cポリペプチドをコードする)、配列番号9(C1qポリペプチドをコードする)、配列番号11(ヒスチジントグ INSP161成熟ポリペプチドをコードする)、配列番号13(ヒスチジントグ INSP161-Aポリペプチドをコードする)、配列番号15(ヒスチジントグ INSP161-Bポリペプチドをコードする)、配列番号17(ヒスチジントグ INSP161-Cポリペプチドをコードする)、配列番号19(ヒスチジントグ C1qポリペプチドをコードする)、配列番号21(INSP161ポリペプチドをコードする)及び/又は配列番号23(ヒスチジン INSP161ポリペプチドをコードする)に記載の核酸配列から成る精製核酸分子、又はこれら配列の何れか一つの重複等価配列(redundant equivalent)又はそのフラグメントを提供する。

【0014】

第三の局面において、本発明は、高いストリンジェンシー条件の下で、上記本発明の第二の局面の核酸分子とハイブリダイズした、精製核酸分子を提供する。

第四の局面において、本発明は、上記本発明の第二又は第三の局面の核酸分子を含む、発現ベクター等のベクターを提供する。

第五の局面において、本発明は、上記本発明の第四の局面のベクターによって形質転換した、宿主細胞を提供する。

第六の局面において、本発明は、上記本発明の第一の局面のc1qドメイン含有タンパク質と特異的に結合するリガンドを提供する。

第七の局面において、本発明は、上記本発明の第一の局面のポリペプチドをコードする天然遺伝子の発現を変更する、又は上記本発明の第一の局面のポリペプチドの活性を調節するのに効果的な化合物を提供する。

本発明の第七の局面に従う化合物は、該遺伝子の発現レベル又は該ポリペプチドの活性レベルを、増大(作動)又は低下(相殺)することができる。重要なことは、INSP161ポリペプチドの機能の同定が、疾患の治療及び/又は診断において効果的な化合物の同定を可能とする、スクリーニング法の設計を可能とすることである。本発明の第六及び第七の局面によるリガンド及び化合物は、このような方法を利用して同定することができる。これら方法を、本発明の特徴としてここに含める。

【0015】

第八の局面において、本発明は、c1qドメイン含有タンパク質が関与している疾患の治療又は診断において使用するための、上記本発明の第一の局面のポリペプチド、又は上記

本発明の第二又は第三の局面の核酸分子、又は上記本発明の第四の局面のベクター、又は上記本発明の第五の局面の宿主細胞、又は上記本発明の第六の局面のリガンド、又は上記本発明の第七の局面の化合物を提供する。このような疾患には以下が含まれる：細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、遺伝的疾患、発育障害、神経系疾患、代謝障害、感染及び他の病的状態；特に免疫疾患、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡及び多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪液質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後疲労症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、新形成疾患（例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍）、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、卒中、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経疾患、男性不妊症、老化及び感染（アメーバ感染、細菌感染及びウイルス感染を含む）、骨若しくは軟骨形成又は維持に関連する疾患、遺伝性疾患及び他の病的状態。好ましくは、前記疾患は以下から選択される：自己免疫疾患、自己免疫内耳疾患、迷路炎、メニエール病及びメニエール症候群、外リンパ又は迷路フィステル、耳鳴、神経変性疾患、アミロイド症、アルツハイマー病、パーキンソン病、家族性痴呆、炎症、微生物疾患、細菌性疾患、ウイルス性疾患（HIV、HTLV又はMuLV感染）、SLE、糸球体腎炎、肥満、糖尿病、シュミット骨端線軟骨形成不全、角膜内皮異栄養症、後部多形性角膜異栄養症（PPCD）、フック内皮角膜異栄養症（FECD）、アテローム性硬化症、壊血病、癌、胃腸管支質腫瘍、骨肉腫、軟骨芽細胞腫、巨細胞腫瘍、脊椎骨端線形成不全日本人型（SMD）、骨形成不全、エーレルス-ダンロー症候群、頸部動脈切開に対する感受性、エーレルス-ダンロー症候群、大動脈動脈瘤、耳脊椎巨大骨端形成不全（otospondylomegaepiphyseal dysplasia）、聴力消失（聾）、バイセンバッチャー-ツヴァイミュラー（Weissenbacher-Zweymuller）症候群、関節炎、骨若しくは骨格の疾患、晩発性網膜変性（L-ORD）、年齢性黄斑変性（AMD）及びノ又は失明。これらの分子はまた、またこのような疾患を治療するための医薬の製造においても使用できる。これらの分子はまた、避妊で又は不妊を含む生殖器疾患の治療に用いることができる。

10

20

30

【0016】

第九の局面において、本発明は、患者における疾患の診断方法を提供することであり、該方法は、該患者由来の組織内の、本発明の上記第一の局面のポリペプチドをコードする、天然遺伝子の発現レベルを評価するか、あるいは本発明の上記第一の局面のポリペプチドの活性を評価する工程、及び該発現又は活性のレベルを、コントロールのレベルと比較する工程を含み、この方法においては、該コントロールレベルと異なるレベルが、疾患の指標となる。このような方法は、好ましくはインビトロで行われる。同様な方法を、患者内の疾患の治療処置を追跡するために使用でき、ここでは、所定期間（period of time）に渡り、ポリペプチド又は核酸分子の発現レベル又は活性レベルの、コントロールレベルに向かう変化が、該疾患の退行を示す。

本発明の第一の局面のポリペプチドを検出するための好ましい方法は、(a) 本発明の第六局面のリガンドと、生物学的サンプルとを、リガンド-ポリペプチド複合体（complex）を生成するのに適した条件下で接触させる工程、及び(b) 該複合体を検出する工程とを含む。

40

当業者は、本発明の第九局面に従う、多数の異なる方法、例えば短いプローブと核酸とのハイブリダイゼーション、点突然変異分析、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、及び抗体を使用して、異常タンパクレベルを検出する方法等が存在することに気付くであろう。短期又は長期に渡り、同様な方法を利用して、患者内の追跡すべき疾患を治療処置することも可能である。本発明は、また疾患を診断するために、これら方法において有用なキットをも提供する。

【0017】

50

第十の局面において、本発明は、本発明の第一の局面によるポリペプチドの、c1qドメイン含有としての使用法を提供する。本発明のポリペプチドの、c1qドメイン含有タンパク質としての適当な使用法は、受胎のコントロール及び卵胞発育のための使用、レセプター/リガンド対の一部としての使用、及び上に与えられたリストから選択される、生理的又は病理学的状態に関する診断マーカーとしての使用を包含する。

第11の局面において、本発明は薬理組成物を提供するものであり、この組成物は、本発明の第一の局面のポリペプチド、又は本発明の第二又は第三局面の核酸分子、又は本発明の第四局面のベクター、又は本発明の第五局面の宿主細胞、又は本発明の第六局面のリガンド、又は本発明の第七局面の化合物を、製薬上許容される担体と共に含有する。

第12の局面において、本発明は、疾患を診断又は治療するための医薬の製造において使用するための、本発明の第一の局面のポリペプチド、又は本発明の第二又は第三局面の核酸分子、又は本発明の第四局面のベクター、又は本発明の第五局面の宿主細胞、又は本発明の第六局面のリガンド、又は本発明の第七局面の化合物を提供する。

10

【0018】

第13の局面において、本発明は、患者における疾患の治療法を提供するものであり、該方法は、本発明の第一の局面のポリペプチド、又は本発明の第二又は第三局面の核酸分子、又は本発明の第四局面のベクター、又は本発明の第五局面の宿主細胞、又は本発明の第六局面のリガンド、又は本発明の第七局面の化合物を、患者に投与する工程を含む。

本発明の第一の局面のポリペプチドをコードする天然遺伝子の発現、又は本発明の第一の局面のポリペプチドの活性が、健康な患者における該発現又は活性のレベルと比較した場合に、疾患に罹患した患者においてより低いような疾患については、該患者に投与される該ポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物は、アゴニストとなるはずである。逆に、該天然遺伝子の発現又は該ポリペプチドの活性が、健康な患者における該発現又は活性のレベルと比較した場合に、疾患に罹患した患者においてより高いような疾患については、該患者に投与される該ポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物は、アンタゴニストとなるはずである。このようなアンタゴニストの例は、アンチセンス核酸分子、リボザイム及びリガンド、例えば抗体を包含する。

20

第14の局面において、本発明は、本発明の第一の局面のポリペプチドを、より高い又はより低いレベルで発現し、又はこれを発現しないように形質転換されている、トランスジェニック又はノックアウト非-ヒト動物を提供する。このようなトランスジェニック動物は、疾患研究用の極めて有用なモデルであり、またこのような疾患の治療又は診断において有効な、化合物を同定するためのスクリーニング管理体制において使用することも可能である。

30

【0019】

本発明を利用するのに使用できる標準的な技術及び手順の概要を、以下に与える。本発明が、記載されるこれら特定の方法論、プロトコール、細胞系、ベクター及び試薬に限定されるものではないことを理解すべきである。また、ここで使用する用語は、特定の態様を説明する目的においてのみ使用するものであり、この用語によって本発明が何等限定されるものではないと、理解すべきである。本発明の内容は、添付した特許請求の範囲によってのみ限定されるものである。

40

本明細書においては、ヌクレオチド及びアミノ酸に対して標準的な略号を用いる。

本発明の実施では、特に断らない限り、当業者の実務範囲にある、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術及び免疫学の公知の技術を使用する。

このような技術は、文献において十分に説明されている。参照するのに特に適したテキストの例は、以下に列挙する通りである：サムブロックモレキュラークローニング；アラボラトリーマニュアル(Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual), 第二版(1989)；DNAクローニング(DNA Cloning), vols. I & II (D.N. Glover編, 1985)；オリゴヌクレオチド合成(Oligonucleotide Synthesis)(M.J. Gait編, 1984)；核酸のハイブリダイゼーション(Nucleic Acid Hybridization)(B.D. Hames & S.J. Higgins編, 1984)；転写及び翻訳(Transcription and Translation)(B.D. Hames & S.J. Higgins編, 1984)；動物細

50

胞培養(Animal Cell Culture)(R.I. Freshney編, 1986); 固定化細胞及び酵素(Immobilized Cells and Enzymes)(IRLプレス, 1986); B. Perbal, 分子クローニングに関する実務ガイド(A Practical Guide to Molecular Cloning)(1984); 酵素学における方法(the Methods in Enzymology)シリーズ(アカデミックプレス社),特に vols. 154 & 155; 哺乳動物細胞に関する遺伝子トランスファーベクター(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)(J.H. Miller & M.P. Calos編, 1987,コールドスプリングハーバーラボラトリー); 細胞及び分子生物学における免疫化学的方法(Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology)(Mayer & Walker編, 1987,アカデミックプレス、ロンドン); Scopes, (1987), タンパク質の精製: 原理と実際(Protein Purification: Principles and Practice)(スプリングァーフェアラグ(Springer Verlag), N.Y.); 及び実験的免疫学の手引き(Handbook of Experimental Immunology), vols. I-IV (D.M. Weir & C.C. Blackwell編, 1986)。 10

【0020】

ここで使用する用語「ポリペプチド」とは、ペプチド結合、又は修飾ペプチド結合、即ちペプチドアイソスターによって相互に結合した、2又はそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又はタンパク質を含む。この用語は、単鎖(ペプチド及びオリゴペプチド)及びより長い連鎖(タンパク質)両者に関連する。

本発明のポリペプチドは、成熟タンパク質状態であり得、またプレ-、プロ-又はプレプロ-タンパクであり得、該プレ-、プロ-又はプレプロ-タンパクの開裂により活性化して、活性な成熟ポリペプチドを生成することができる。このようなポリペプチドにおいて、該プレ-、プロ-又はプレプロ-配列は、リーダー又は分泌配列であり得、また該成熟ポリペプチド配列の精製の目的で使用される配列であり得る。 20

本発明の第一局面のポリペプチドは、融合タンパクの一部を形成し得る。例えば、分泌又はリーダー配列、プロ-配列、精製において役立つ配列、又は例えば組換え体の製造中に、より高いタンパクの安定性を付与する配列を含むことができる、1又はそれ以上の追加のアミノ酸配列を含むことが、しばしば有利である。あるいはまた、もしくは付随的に、該成熟ポリペプチドは、他の化合物、例えば該ポリペプチドの半減期を長くする化合物(例えば、ポリエチレングリコール)と融合することができる。

【0021】

ポリペプチドは、20種の遺伝子によりコードされるアミノ酸以外のアミノ酸、即ち翻訳後のプロセッシング等の自然の過程により、あるいは当分野において周知の化学的変性技術 30
によって修飾されたアミノ酸を含むことができる。本発明のポリペプチドにおいて通常存在し得る、該公知の修飾としては、グリコシル化、脂質の付着、硫酸化、グルタミン酸残基等の -カルボキシル化、ヒドロキシル化及びADP-リボシル化がある。他の可能な修飾はアセチル化、アシル化、アミド化、フラビンの共有結合による付着、ヘム部分の共有結合による付着、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合による付着、脂質誘導体の共有結合による付着、ホスファチジルイノシトールの共有結合による付着、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合性の架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、GPIアンカー形成、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク分解プロセッシング、ホスホリル化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化(selenoylation)、アルギニル化等の、タンパク質に対するアミノ酸のtRNA媒 40
介付加、及びユビキチン化を包含する。

修飾は、ポリペプチドの骨格、そのアミノ酸側鎖、及びそのアミノ又はカルボキシル末端を含む、該ポリペプチドのどの部分でも起こり得る。事実、ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端、又はこれら両者における、共有結合による遮断は、天然に産するポリペプチド及び合成ポリペプチドにおいて共通であり、またこのような修飾は、本発明のポリペプチドにおいても存在する。

【0022】

ポリペプチドにおいて起こるこれら修飾は、しばしば該ポリペプチドを製造した方法の関数である。組換えにより製造したポリペプチドに関して、その大部分における該修飾の性質及び程度は、特定の宿主細胞の翻訳後の修飾能力及び問題とするポリペプチドのアミ 50

ノ酸配列中に存在する修飾シグナルによって決定されるであろう。例えば、グリコシル化パターンは、異なる型の宿主細胞間で変化する。

本発明のポリペプチドは、任意の適当な方法で製造できる。このようなポリペプチドは、単離された天然に産するポリペプチド(例えば、細胞培養物から精製されたもの)、組換え技術により製造したポリペプチド(融合タンパク質を含む)、合成により製造したポリペプチド又はこれら方法の組合せにより製造したポリペプチドを包含する。

本発明の第一局面による、機能的に等価なポリペプチドは、INSP161ポリペプチドと相同性のポリペプチドであり得る。2種のポリペプチドは、その一方のポリペプチドの配列が、その他方のポリペプチドの配列に対して十分に高い同一性又は類似性の度合いを持つ場合に、ここで使用する用語の意味としての、「相同」であるといわれる。「同一性」とは、整列された配列中の、任意の特定位置において、そのアミノ酸残基が、これら配列間で同一であることを示す。「類似性」とは、整列された配列中の、任意の特定位置において、そのアミノ酸残基が、これら配列間で類似型のものであることを示す。同一性又は類似性の度合いは、容易に計算できる(計算機による分子生物学(Computational Molecular Biology), A.M. Lesk編, Oxford University Press, NY, 1988; バイオコンピューティングインフォマティクス及びゲノムプロジェクト(Biocomputing Informatics and Genome Projects), D.W. Smith編, アカデミックプレス, NY, 1993; 配列データのコンピュータ解析(Computer Analysis of Sequence Data), Part I, A.M. Griffin & H.G. Griffin編, フマナプレス, NJ, 1994; 分子生物学における配列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology), von Heinje, G., アカデミックプレス, 1987; 及び配列分析、プライマー((Sequence Analysis Primer), M. Gribskov & J. Devereux編, M Stockton Press, New York)。ここで使用するパーセント同一性は、BLASTヴァージョン2.1.3を用い、NCBI(National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)によって特に定められた規定値パラメータを用いて決定されるようなものである[ブロッサム(Blosum)62マトリックス; ギャップオープンペナルティー=11、及びギャップエクステンションペナルティー=1]。

10

20

【0023】

相同ポリペプチドは、従って該INSP161ポリペプチドの、天然産の生物学的変異体(例えば、該ポリペプチドを誘導した種内の、対立変異体又は地理的変異体)及び突然変異体(例えば、アミノ酸置換、挿入又は欠失を含む突然変異体)を包含する。このような突然変異体は、1以上のアミノ酸残基が、保存性又は非-保存性のアミノ酸残基(好ましくは、保存性アミノ酸残基)で置換されているポリペプチドを含むことができ、またこのような置換アミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるものであっても、コードされないものであってもよい。典型的なこの種の置換は、Ala、Val、Leu及びIle間で、SerとThrとの間で、酸性残基AspとGluとの間で、AsnとGlnとの間で、塩基性残基LysとArgとの間で、あるいは芳香族性残基PheとTyrとの間で起こる。特に好ましいものは、幾つかの、即ち5と10、1と5、1と3、1と2又は1のみのアミノ酸が、任意の組合せで置換、欠失又は付加されている変異体である。とりわけ好ましいものは、沈黙置換、付加及び欠失であり、これらは該タンパク質の特性及び活性を変更しない。同様に、この点に関して特に好ましいものは、保存性の置換である。このような突然変異体は、また1又はそれ以上のアミノ酸残基が、置換基を含むポリペプチドを包含する。

30

40

典型的には、2つのポリペプチド間の30%を越える同一性は、機能的に等価なものを示すものと考えられる。好ましくは、本発明の第一局面の機能的に等価なポリペプチドは、80%を越える、該INSP161ポリペプチドとの、又はその活性フラグメントとの配列同一性を持つ。より好ましくは、ポリペプチドは、夫々85%、90%、95%、98%又は99%を越える程度の同一性を持つ。

【0024】

本発明の第一局面の機能的に等価なポリペプチドは、また1又はそれ以上の構造的な整列技術を利用して同定されたポリペプチドであっても良い。例えば、バイオペンジウム(BiopendiumTM)検索データベースを生成するのに使用する研究手段の第一局面を構成する、イ

50

ンファーマチカゲノムスレッダー(Inpharmatica Genome Threader)技術を用いて(PCT出願 WO 01/69507を参照のこと)、現時点において未知の機能を持つポリペプチドを同定することができる。該未知の機能を持つポリペプチドは、該 INSP093及び INSP094ポリペプチドと比較して低い配列同一性を持つが、該 INSP161ポリペプチド配列との、有意な構造上の相同性を持つことによって、c1qドメイン含有タンパク質であると予想されている。「有意な構造上の相同性」とは、インファーマチカゲノムスレッダーが、2種のタンパク質について、10%及びそれ以上の確実性にて、構造上の相同性を分け合っているものと予測したことを意味する。

本発明の第一局面のポリペプチドは、また該 INSP161ポリペプチドのフラグメントもしくは該 INSP161ポリペプチドの機能的に等価なフラグメントを含むが、これらのフラグメントは、c1qドメイン含有タンパク質であるか、あるいは該 INSP161ポリペプチドと共通の抗原決定基を持つことを条件とする。

10

【0025】

ここで使用する用語「フラグメント」とは、該 INSP161ポリペプチド又はその機能的等価物の一種の、アミノ酸配列の全てではないが、その一部と同一のアミノ酸配列を持つポリペプチドを意味する。これらフラグメントは、少なくともn個の、該配列由来の連続するアミノ酸を含み、また特定の配列に依存して、このnは、好ましくは7又はそれ以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20又はそれ以上)である。小さなフラグメントが、抗原決定基を形成し得る。

完全な長さの該 INSP161ポリペプチドのフラグメントは、夫々該 INSP161ポリペプチド配列内の2又は3個の隣接するエキソン配列の組合せからなるものであり得る。例えば、このような組合せは、エキソン1及びエキソン2、エキソン2及び3、又はエキソン1及び3などを含む。このようなフラグメントは本発明の範囲に含められる。

20

このようなフラグメントは、「それ自体独立した(free-standing)」ものであり得、即ち他のアミノ酸又はポリペプチドの一部でも、これと融合されたものでもなく、あるいはこれらは、より大きなポリペプチド内に含まれ、その一部又は領域を構成するものであっても良い。より大きなポリペプチド内に含まれる場合、本発明のフラグメントは、最も好ましくは単一の連続する領域を構成する。例えば、幾つかの好ましい態様は、アミノ末端に対して融合したプレ-及び/又はプロ-ポリペプチド領域を持つフラグメント及び/又は該フラグメントのカルボキシ末端に対して融合した追加の領域を持つフラグメントに関連する。しかし、幾つかのフラグメントは、単一の大きなポリペプチド内に含まれるものであり得る。

30

【0026】

本発明のポリペプチド又はその免疫原性フラグメント(少なくとも一つの抗原決定基を含む)は、該ポリペプチドに対して免疫特異的である、ポリクローナル又はモノクローナル抗体等のリガンドを生成するのに利用できる。このような抗体は、本発明のポリペプチドを発現するクローンの単離又は同定のために、又はアフィニティークロマトグラフィーによる該ポリペプチドの精製の目的で使用できる。これら抗体は、また当業者には明らかな如く、他にも用途があるが、特に診断又は治療用助剤として使用することができる。

上記用語「免疫特異的(immunospecific)」とは、これらの抗体が、公知の他の関連するポリペプチドに対するアフィニティーよりも、本発明のポリペプチドに対して、実質的に大きなアフィニティーを持つことを意味する。ここで使用する用語「抗体」とは、完全な分子並びにそのフラグメント、あるいはFab、F(ab')₂及びFvを意味し、これらは問題とする抗原決定基と結合することができる。従って、このような抗体は、本発明の第一局面のポリペプチドと結合する。

40

「実質的に大きなアフィニティー」なる用語によって、我々は、既知の分泌されたタンパク質に対するアフィニティーと比較して、本発明のポリペプチドに対するアフィニティーに、測定可能な増加が見られることを意味する。

【0027】

好ましくは、このアフィニティーは、既知の分泌されたタンパク質、例えばc1qドメイ

50

ン含有タンパク質よりも、本発明のポリペプチドに対して、少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、 10^3 -倍、 10^4 -倍、 10^5 -倍、 10^6 -倍又はそれ以上である。

ポリクローナル抗体が望ましい場合には、選択された哺乳動物、例えばマウス、ウサギ、ヤギ又はウマを、本発明の第一局面のポリペプチドにより、免疫感作することができる。該動物を免疫感作するのに使用する該ポリペプチドは、組換えDNA技術によって誘導することができる、あるいは化学的に合成することができる。望ましくは、該ポリペプチドは、担体タンパク質との複合体を形成することができる。該ポリペプチドを化学的に結合できる、通常使用される担体は、ウシ血清アルブミン、チログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニンを含む。次いで、この結合したポリペプチドを、該動物の免疫感作のために使用する。この免疫化した動物由来の血清を集め、公知の手順、例えばイムノアフィニティークロマトグラフィーによって処理する。

本発明の第一局面のポリペプチドに対するモノクローナル抗体も、当業者は容易に製造できる。ハイブリドーマ技術を用いた、モノクローナル抗体を製造するための一般的な方法は周知である(例えば、Kohler, G. & Milstein, C., *Nature*, 1975, 256:495-497; Kozbor等, *Immunology Today*, 1983, 4:72; Cole等, *モノクローナル抗体及び癌治療 (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc. (1985)を参照のこと)。

【0028】

本発明の第一局面のポリペプチドに対して製造したモノクローナル抗体のパネルを、様々な特性、例えばイソタイプ、エピトープ、アフィニティー等についてスクリーニングすることができる。モノクローナル抗体は、これらに対して導かれた、個々のポリペプチドの精製において、特に有用である。あるいはまた、対象とするモノクローナル抗体をコードする遺伝子は、ハイブリドーマから、例えば当分野において公知のPCR技術によって単離し、また適当なベクターにクローニングし、かつそこで発現させることができる。非-ヒト可変部が、ヒト定常部と結合もしくは融合するキメラ抗体(例えば、Liu等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84:3439)も、有用であり得る。

この抗体は、例えばヒト化によって、個体内で、低免疫原性のものとなるように変性することができる(以下の文献を参照のこと: Jones等, *Nature*, 1986, 321:522; Verhoeyen等, *Science*, 1988, 239:1534; Kabat等, *J. Immunol.*, 1991, 147:1709; Queen等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:10029; Gorman等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88:34181;及びHodgson等, *Bio/Technology*, 1991, 9:421)。本明細書で使用する「ヒト化抗体」とは、非-ヒトドナー抗体の重鎖及び/又は軽鎖の可変部ドメインにおけるCDRアミノ酸及び選択された他のアミノ酸が、ヒト抗体における等価なアミノ酸の代わりに置換されている、抗体分子を意味する。従って、このヒト化抗体は、ヒト抗体と厳密に類似するが、該ドナー抗体の結合能を持つ。

更にまた、該抗体は、「二重特異性」抗体であり得、これは2つの異なる抗体結合ドメインを持つ抗体であり、各ドメインは異なるエピトープに対するものである。

【0029】

ファージディスプレイ技術は、関連する抗体の存在につきスクリーニングされた、ヒト由来のリンパ細胞の、PCR増幅されたV-遺伝子のレパトリーから、あるいはナイーブ(naive)ライブラリーから、本発明のポリペプチドに対する結合活性を持つ、抗体をコードする遺伝子の選別のために利用できる(McCafferty, J.等, *Nature*, 1990, 348:552-554; Mark, J.等, *Biotechnology*, 1992, 10:779-783)。これら抗体のアフィニティーは、また連鎖シャッフリングによっても改善できる(Clackson, T.等, *Nature*, 1991, 352:624-628)。

ポリクローナルであれ、モノクローナルであれ、上記技術により生成された抗体は、イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)における試薬として使用できる点で、付随的な有用性を持つ。これら用途において、これら抗体は、放射性同位元素、蛍光性分子又は酵素等の、分析により検出可能な試薬で標識することができる。

10

20

30

40

50

本発明の第二及び第三局面の好ましい核酸分子は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22及び配列番号24に記載のようなポリペプチド配列及び機能的に等価なポリペプチドをコードするものである。これらの核酸分子は、ここに記載する方法並びに用途において使用することができる。本発明の核酸分子は、好ましくは少なくともn個の、ここに記載する該配列由来の連続するヌクレオチドを含み、ここで特定の配列に依存して、このnは、10又はそれ以上(例えば、12、14、15、18、20、25、30、35、40又はそれ以上)である。

本発明の核酸分子は、また上記の核酸分子に対して相補的な配列(例えば、アンチセンス又はプロービングのための)をも包含する。

10

【0030】

本発明の核酸分子は、mRNA等のRNA、例えばcDNA、合成DNA又はゲノムDNA等を包含するDNAの形状を持つことができる。このような核酸分子は、クローニング、化学的な合成技術、又はこれらの組合せによって得ることができる。これら核酸分子は、例えば固相ホスホロアミダイト化学合成等の技術を用いて、ゲノム又はcDNAライブラリーから、あるいは生物からの分離によって、製造することができる。RNA分子は、一般にDNA配列のインビボ又はインビトロ転写によって、生成し得る。

これらの核酸分子は一本鎖又は二本鎖何れであっても良い。一本鎖DNAは、センスストランドとしても知られる、コードストランドであり得、あるいはアンチセンスストランドとしても知られる、非-コードストランドであっても良い。

20

用語「核酸分子」とは、またDNA及びRNAの類似体、例えば修飾された骨格を持つもの及びペプチド核酸(PNA)を含む。ここで使用する用語「PNA」とは、好ましくはリジンで終端する、アミノ酸残基を含むペプチド骨格と結合した、少なくとも5個のヌクレオチドに相当する長さを持つ、オリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス分子又はアンチ-ジーン(anti-gene)剤を意味する。該末端リジンは、この構造に溶解性を付与する。PNAは、ペギレート化(pegylated)して、細胞内でのその寿命を延長することができ、ここで該PNAは、相補性の一本鎖DNA及びRNAと優先的に結合しかつ転写物の伸長を停止することができる(Nielsen, P.E.等, *Anticancer Drug Des.*, 1993, 8:53-63)。

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、ここに記載する核酸分子の1種又はそれ以上のコード配列と同一であり得る。

30

【0031】

これらの分子は、また遺伝的コード縮重の結果として、ポリペプチド：配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22又は配列番号24をコードする、異なった配列を持つことができる。このような核酸分子は、該成熟ポリペプチド自体に対するコード配列；該成熟ポリペプチドに対するコード配列及び追加のコード配列、例えばプロ-、プレ-又はブレプロ-ポリペプチド配列等のリーダー又は分泌配列をコードするもの；上記追加のコード配列との組合せで又は単独で、転写(終止シグナルを含む)、リボソーム結合及びmRNAの安定性においてある役割を演じる、転写された、非-翻訳配列等の、非-コード5'及び3'配列を包含する、更なる追加の、非-コード配列を含む、該成熟ポリペプチドに対するコード配列を包含するが、これらに限定されない。これらの核酸分子は、また付随的な官能性をもたらすもの等の、追加のアミノ酸をコードする、付随的な配列を含むこともできる。

40

本発明の第二及び第三局面の核酸分子は、また該ポリペプチドのフラグメント又はその機能的な等価物及び本発明の第一局面のフラグメントをもコードし得る。このような核酸分子は、天然に産する変異型、例えば天然に産するアレリック変異型であり得、あるいは該分子は、天然に産することが知られていない変異型であり得る。該核酸分子の天然産以外のこのような変異型は、突然変異誘発技術、例えば核酸分子、細胞又は器官に適用されるものを含むこれら技術により、製造することができる。

【0032】

この点に関連して、変異型としては、特にヌクレオチド置換、欠失又は挿入によって、

50

上記核酸分子とは異なる変異体を挙げることができる。この置換、欠失又は挿入は、1又はそれ以上のヌクレオチドを含む。該変異体は、コード、非-コード領域又は両者において変更することができる。コード領域における変更は、保存性又は非-保存性アミノ酸の置換、欠失又は挿入を発生する可能性がある。

また、本発明の核酸分子は、該遺伝子生成物(ポリペプチド)のクローニング、プロセッシング、及び/又は発現を含む様々な理由で、当業者において一般的に公知の方法を用いて、操作することができる。ランダムフラグメント化及び遺伝子フラグメント及び合成オリゴヌクレオチドのPCR再集合(PCR reassembly)によるDNAシャッフリングは、該ヌクレオチド配列を操作するために使用できる技術として含まれる。サイト特異的突然変異誘発を利用して、新たな制限サイトの挿入、グリコシル化パターンの変更、コドンの優先性の変更、切片変異型の生成、突然変異の導入等を可能とする。

本発明の第一局面のポリペプチドをコードする核酸分子は、異種配列と結合し、融合タンパク質をコードする、結合核酸分子を得ることを可能とする。このような結合核酸分子は、本発明の第二又は第三の局面に含まれる。例えば、該ポリペプチドの活性の阻害剤に関するペプチドライブラリーをスクリーニングするために、このような結合核酸分子を用いて、市販品として入手できる抗体により認識できる、融合タンパク質を発現するのに有用であり得る。融合タンパク質を、本発明によるポリペプチドの配列と、異種タンパク質の配列との間に位置する開裂サイトを含むように操作して、該ポリペプチドを、該異種タンパク質から開裂し、かつこれから精製し得るようにすることが可能である。

【0033】

本発明の核酸分子は、また本発明のポリペプチドをコードする核酸分子と、部分的に相補的であり、またその結果として該コード核酸分子とハイブリッドを形成する(ハイブリダイゼーション)、アンチセンス分子を含む。このようなアンチセンス分子、例えばオリゴヌクレオチドは、当業者には公知であるように、本発明のポリペプチドをコードする、ターゲット核酸を識別し、特異的にこれと結合し、かつその転写を阻止するように設計することができる(例えば、Cohen, J.S. Trends in Pharm. Sci., 1989, 10:435; Okano, J. Neurochem. 1991, 56:560; O'Connor, J. Neurochem. 1991, 56:560; Lee等, Nucleic Acids Res. 1979, 6:3073; Cooney等, Science, 1988, 241:456; Dervan等, Science, 1991, 251:1360を参照のこと)。ここで使用する用語「ハイブリダイズする」とは、2つの核酸分子の、水素結合による相互の結合を意味する。典型的には、1個の分子が固体担体に固定され、また他方の分子は溶液中で遊離状態にある。次いで、これら2つの分子を、水素結合にとって好ましい条件下で、相互に接触状態に置くことができる。この結合に影響を及ぼす因子は、溶媒の型及び体積、反応温度、ハイブリダイゼーションの時間、攪拌、該液相中の分子の、該固体担体への非-特異的な結合を遮断する試薬(デンハート試薬又はBLOTTO); 該分子の濃度、分子の結合速度を高めるための試薬(デキストランサルフェート又はポリエチレングリコール)、及びハイブリダイゼーション後の洗浄条件のストリンジエンシーを包含する(Sambrook等の[上記文献]を参照のこと)。

ターゲット分子と完全に相補的な分子のハイブリダイゼーションの阻害は、当分野において公知である如く、ハイブリダイゼーションアッセイを利用して検討することができる(例えば、Sambrook等の[上記文献]を参照のこと)。従って、実質的に相同な分子は、Wahl, G.M. & S.L. Berger (Methods Enzymol. 1987, 152:399-407)及びKimmel, A.R. (Methods Enzymol. 1987, 152:507-511)において教示されているように、様々なストリンジエンシー条件下で、ターゲット分子と完全に相補的な分子の結合と競合し、かつ阻害するであろう。

【0034】

「ストリンジエンシー」とは、非常に似通っている分子同士の結合を、異なる分子間の結合よりも好ましいものとする、ハイブリダイゼーション反応における条件を意味する。高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、50%のホルムアミド、5XSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸3ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5xデンハート溶液、10%デキストランサルフェート、及び20µg/mlの変性、剪断サケ精液DNAを含む

10

20

30

40

50

溶液中で、42℃にて一夜インキュベートし、次いで該フィルターを約65℃にて0.1X SSCで洗淨するものとして定義される。低ストリンジェンシー条件は、このハイブリダイゼーション反応を35℃にて行うことを含む(Sambrook等の[上記文献]を参照のこと)。好ましくは、ハイブリダイゼーションのために使用するこれら条件は、高度にストリンジェンシーな条件である。

本発明のこの局面の好ましい態様は、該INSP161ポリペプチドをコードする核酸分子に対して、同一性が、全長に渡り少なくとも70%である核酸分子、及びこのような核酸分子に対して実質的に相補的な核酸分子である。好ましくは、本発明のこの局面による核酸分子は、このようなコード配列に対して、同一性が、全長に渡り少なくとも80%である領域を含み、あるいは該コード配列に対して相補的な核酸分子である。この点に関連して、該コード配列に対して、同一性が、全長に渡り少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%、99%又はそれ以上である核酸分子が、特に好ましい。この点に関連して好ましい態様は、該INSP161ポリペプチドと同一の生物学的機能又は活性を実質的に維持する、ポリペプチドをコードする核酸分子である。

10

【0035】

本発明は、また本発明の核酸分子を検出するための方法をも提供するものであり、この方法は、以下に列挙する諸工程を含む：(a) 本発明による核酸プローブと、生物学的サンプルとを、デュプレックスを形成するハイブリダイゼーション条件下で、接触させる工程、及び(b) 形成されるあらゆるこのようなデュプレックスを検出する工程。

以下において、本発明に従って使用することのできるアッセイとの関連で、付随的に論じるように、上記のような核酸分子は、RNA、cDNA又はゲノムDNAに対するハイブリダイゼーション用のプローブとして使用して、該INSP161ポリペプチドをコードする完全な長さのcDNA及びゲノムクローンを単離し、またこのポリペプチドをコードする遺伝子に対して高い配列類似性を持つ、相同又はオーソログス遺伝子のcDNA及びゲノムクローンを単離することができる。

20

この点に関連して、当分野において公知の、特に以下の技術を利用することができ、またこれらを例示の目的で以下に論じる。DNAの配列決定法及び分析法は周知であり、また当分野において一般的に利用でき、実際に、ここで論じる本発明の多くの態様を実施するのに利用できる。このような方法は、酵素、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、シーケナーゼ(Sequenase; OH、クリーブランドのUSバイオケミカル社(US Biochemical Corp.))、Taqポリメラーゼ(パーキンエルマー(Perkin Elmer))、熱安定性T7ポリメラーゼ(IL、シカゴのアマーシャム(Amersham))、又はポリメラーゼとプルーフリーディングエキソヌクレアーゼ、例えばギブコ/BRL(MD、ガイザースバーグ)により市販されている、ELONGASE増幅システム(Amplification System)において見出されるものとの組合せを使用することができる。好ましくは、配列決定法は、ハミルトンマイクロラボ(Hamilton Micro Lab) 2200 (NV、レノのハミルトン社)、ペルチエサーマルサイクラー(Peltier Thermal Cycler)(PTC200; MA、ウォータータウンのMJリサーチ(MJ Research)社)及びABIカタリスト(Catalyst)及び373及び377DNAシーケンサ(Sequencers;パーキンエルマー)等の装置を使用して、自動化することができる。

30

【0036】

該INSP093ポリペプチドと等価な機能を持つポリペプチドをコードする核酸分子を単離するための一つの方法は、当分野において認識されている標準的な手順を用いて、天然又は人工的に設計したプローブを用いて、ゲノム又はcDNAライブラリーを精査することである(例えば、アウスベル(Ausubel)等(編)の「カレントプロトコールインモレキュラーバイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)」, Greene Publishing Association & John Wiley Interscience, NY, 1989, 1992を参照のこと)。適当なコード遺伝子(配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21及び配列番号23)由来の核酸配列に相当する、あるいはこれに対して相補的な、少なくとも15個の、好ましくは少なくとも30個の、及びより好ましくは少なくとも50個の、連続する塩基を含むプローブが、特に有用なプ

40

50

ローブである。このようなプローブは、分析により検出可能な試薬で標識して、その同定を簡略化することができる。有用な試薬は、放射性同位元素、蛍光性染料及び検出可能な生成物の形成を触媒することのできる酵素を含むが、これらに限定されない。これらのプローブを使用することにより、当業者は、ヒト、哺乳動物又は他の動物源由来の、対象とするタンパク質をコードする、ゲノムDNA、cDNA又はRNAポリヌクレオチドの、相補的なコピーを単離し、かつこのような源を、関連する配列、例えば該群(family)、タイプ及び/又はサブタイプの付随的な構成員についてスクリーニングすることが可能となる。

【0037】

多くの場合において、単離cDNA配列は、該ポリペプチドをコードする領域が、通常は5'末端において、短く切断される点において、不完全である。幾つかの方法を利用して、完全な長さのcDNAを得、もしくは短いcDNAを伸長する。部分的なヌクレオチド配列を使用し、かつ当分野において公知の様々な方法を利用して、このような配列を伸長して、上流側の配列、例えばプロモータ及び調節要素を検出することができる。例えば、使用可能な方法の一つは、cDNA末端の迅速な増幅(Rapid Amplification of cDNA Ends)方法に基くものである(RACE; 例えばFrohman等, PNAS USA 1988, 85:8998-9002を参照)。例えば、マラソン(MarathonTM)技術(クロンテックラボラトリーズ社(Clontech Laboratories Inc.))によって代表される、この技術の最近の改良は、より長いcDNAに関する探索を、大幅に簡略化した。「制限-サイト」PCRと呼ばれる、幾分異なる技術は、既知の遺伝子座と隣接する未知の核酸配列を探し出すために、普遍プライマーを使用する(Sarkar, G., PCR Methods A pplic., 1993, 2:318-322)。また、逆PCRを利用して、既知領域に基いて、多様型プライマーを用いて、配列を増幅し、あるいは伸長することができる(Triglia, T.等, Nucleic Acids Res., 1988, 16:8186)。使用できるもう一つの方法は、捕獲PCRであり、この方法はヒト及び酵母の人工染色体DNAにおける既知の配列に隣接するDNAフラグメントのPCR増幅を含む(Lagerstrom, M.等, PCR Methods Applic., 1991, 1:111-119)。未知の配列を捜し出すために使用できるもう一つの方法は、Parkar, J.D.等の方法(Nucleic Acids Res., 1991, 19:3055-3060)である。更に、PCR、ネステッドプライマー、及びプロモータファインダ(PromoterFinderTM)ライブラリーを使用して、ゲノムDNAを探することができる(CA, パロアルトのクロンテック(Clontech)社)。この方法は、ライブラリーをスクリーニングする必要性を排除し、またイントロン/エキソン結合を見出す上で有用である。

【0038】

完全な長さのcDNAをスクリーニングするに際して、より大きなcDNAを含めるように、サイズ-選別されているライブラリーを使用することが好ましい。また、遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含む点において、無秩序に感作されたライブラリーが好ましい。無秩序に感作されたライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが、完全な長さのcDNAを生成しない状況に対して、特に好ましい可能性がある。ゲノムライブラリーは、5'非-転写調節領域に、配列を伸長するために有用であり得る。

本発明の一態様において、本発明の核酸分子は、染色体を局在化するために使用できる。この技術において、核酸分子を、特に目標とし、また個々のヒト染色体上の特定の位置で、これとハイブリダイズすることができる。本発明による染色体と関連する配列のマッピングは、遺伝子関連疾患と、これら配列との確証的関連付けにおいて重要な段階である。一度、配列が、正確な染色体位置に関してマッピング(位置決定)されると、該染色体上の該配列の物理的な位置は、遺伝子マップデータと関連付けすることができる。このようなデータは、例えばV. McKusick, ヒトにおけるメンデル遺伝(Mendelian Inheritance in Man)(ジョーンズホプキンス大学ウエルチメディカルライブラリー(Johns Hopkins University Welch Medical Library)を通してオンラインで入手可能である)に見られる。次いで、同一の染色体領域にマッピングされている遺伝子と疾患との関連性を、結合分析(物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝)によって同定する。これは、位置クローニング又は他の遺伝子発見技術を用いて、疾患遺伝子を探索する研究者に、価値ある情報を提供する。一旦、該疾患又は症候群が、特定のゲノム領域に対する遺伝的結合によって、大雑把に局在化されれば、該当領域に関するあらゆる配列マッピングが、更なる検討のための、関連

10

20

30

40

50

又は調節遺伝子を表す可能性がある。該核酸分子は、また正常な、キャリアとしての又は罹患した個体における、転位、逆位等による、染色体位置における差異の検出のために使用することができる。

【0039】

本発明の核酸分子は、また組織の局在化にとっても価値がある。このような技術は、また組織内のポリペプチドの発現パターンを、該ポリペプチドをコードするmRNAの検出により、決定することを可能とする。これら技術は、その場でのハイブリダイゼーション技術及びヌクレオチド増幅技術、例えばPCR技術を含む。これらの研究により得られる結果は、該生物における該ポリペプチドの正常な機能の指標を与える。更に、mRNAの正常な発現パターンと、突然変異遺伝子によってコードされるmRNAによる発現パターンとの比較研究は、疾患における突然変異ポリペプチドの役割に関する有益な見識を与える。このような不適当な発現は、時間的、空間的又は定量的特性を持つものである。

10

遺伝子のスライシング法は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の内在的発現をダウンレギュレーションすることも可能である。RNA干渉(RNAi)(Elbashir, SM等, Nature, 2001, 411:494-498)は、利用することのできる、配列特異的な転写後の遺伝子サイレント化法(gene silencing)の一つである。短いdsRNAオリゴヌクレオチドを、インピトロで合成し、かつ細胞内に導入する。これらdsRNAオリゴヌクレオチドの、配列特異的結合は、ターゲットmRNAの分解を開始させ、ターゲットタンパク発現を減少又は削除する。

上で評価した遺伝子サイレント化法の有効性は、ポリペプチド発現の測定(例えば、ウエスタンブロットティング法による)を通して、またTaqManを基本とする方法を利用して、RNAレベルで評価することができる。

20

【0040】

本発明のベクターは、本発明の核酸分子を含み、またクローニング又は発現ベクターであり得る。本発明のベクターによって形質転換、トランスフェクション又は形質導入することのできる、本発明の宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞何れであっても良い。

本発明のポリペプチドは、宿主細胞内に含まれるベクター中のコード核酸分子の発現により、組換え体として作ることができる。このような発現法は、当業者には周知であり、またその多くは、Sambrook等[上記文献]及びFernandez & Hoeffler(1998, 編, 「遺伝子発現系。発現技術に関する特徴を利用(Gene expression systems. Using nature for the art of expression)」アカデミックプレス、サンジエゴ、ロンドン、ボストン、NY、シドニー、東京、トロント)に詳しく記載されている。

30

一般に、所定の宿主内でポリペプチドを製造するためには、核酸分子を維持し、増殖させ又は発現させるのに適した、任意の系又はベクターを使用することができる。この適当なヌクレオチド配列を、様々な周知かつルーチン技術、例えばSambrook等[上記文献]に記載されている技術の何れかによって、発現系に挿入することができる。一般に、該コード遺伝子は、制御要素、例えばプロモータ、リボソーム結合系(バクテリア発現の場合)及び場合によってはオペレータの制御下に置いて、該所定のポリペプチドをコードする該DNA配列を、該形質転換された宿主細胞内のRNAに転写することができる。

【0041】

適当な発現系の例は、例えば染色体、エピソーム及びウイルス由来の系、例えばバクテリアプラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入要素、酵母染色体要素、ウイルス、例えばパキウウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス及びレトロウイルス由来のベクター又はこれらの組合せ、例えばコスミド及びファージミドを含む、プラスミド及びバクテリオファージ遺伝子要素由来のものを包含する。ヒトの人工的な染色体(HACs)も、プラスミド内に含まれ、かつ発現し得るものよりも大きなDNAフラグメントを放出するのに使用できる。ベクター-pCR4-TOPO、pCR4-TOPO-INSP161、pEAK12d、pDEST12.2、pDONR221、pENTR_-INSP161-6HIS、pEAK12d_INSP161-6HIS、pDEST12.2_INSP161-6HISが、INSP161に関連する本発明の局面に従って使用するのに適したベクターの、好ましい例である。

40

50

特に適した発現系は、組換えバクテリオファージ、プラスミド又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換されたバクテリア等の微生物；酵母発現ベクターにより形質転換された酵母；ウイルス(例えば、バキュロウイルス)発現ベクターにより形質転換された昆虫細胞系；ウイルス(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)発現ベクター又はバクテリア発現ウイルス(例えば、Ti又はpBR322プラスミド)により形質転換された植物細胞系；又は動物細胞系を包含する。また、細胞を含まない翻訳系を使用して、本発明のポリペプチドを製造することも可能である。

【0042】

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子の、宿主細胞への導入は、多くの標準的な実験室マニュアル例えばDavis等の分子生物学における基本的な方法(Basic Methods in Molecular Biology)(1986)及びSambrook等[上記文献]に記載されている方法により、行うことができる。特に適した方法は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプローディング(scrape loading)、弾道導入又は感染を包含する(例えば、Sambrook等, 1989 [上記文献]; Ausubel等, 1991 [上記文献]; Spector, Goldman & Leinwald, 1998を参照のこと)。真核生物細胞において、発現系は、該系の必要に応じて、一時的(例えば、エピソード性)又は永続的(染色体への組込み)の何れかであり得る。

該コード核酸分子は、例えば小胞体の内腔、細胞質空間又は細胞外環境に、該翻訳されたポリペプチドを分泌するために望ましい、コントロール配列をコードする配列、例えばシグナルペプチド又はリーダー配列を含んでも、含まなくても良い。これらシグナルは、該ポリペプチドに対して内在性であり得、あるいはこれらは、異種シグナルであり得る。リーダー配列は、翻訳後のプロセッシングにおいて、バクテリア宿主により除去され得る。

【0043】

コントロール配列に加えて、該宿主細胞の成長と相対的に、該ポリペプチドの発現を調節することを可能とする、調節配列を付加することが望ましい可能性がある。調節配列の例は、調節化合物の存在を含む化学的又は物理的な刺激、又は様々な温度又は代謝条件に応答して、遺伝子発現の増減を引起すものである。調節配列は、該ベクターの非-翻訳領域のもの、例えばエンハンサ、プロモータ及び5'及び3'未翻訳領域である。これらは、宿主細胞タンパクと相互作用して、転写及び翻訳を行う。このような調節配列の長さ及び特異性は、変動し得る。使用したベクター系及び宿主に依存して、構成的及び誘導性プロモータを含む、任意の数の適当な転写及び翻訳要素を用いることができる。例えば、バクテリア系内でクローニングする場合、誘導性プロモータ、例えばBluescriptファージミド(CA、ラジヨラのストラタジーヌ(Stratagene))又はpSport1TMプラスミド(ギブコBRL)等のハイブリッドlacZプロモータ等を使用することができる。バキュロウイルスポリヘドリンプロモータを、昆虫細胞内で使用することができる。植物細胞ゲノム由来(例えば、熱ショック、RUBISCO及び貯蔵タンパク遺伝子)又は植物ウイルス(例えば、ウイルスプロモータ又はリーダー配列)由来のプロモータ又はエンハンサを、このベクターにクローニングすることができる。哺乳動物細胞系においては、哺乳動物遺伝子又は哺乳動物ウイルス由来のプロモータが好ましい。該配列の複数のコピーを含む細胞系を生成する必要がある場合には、SV40又はEBVに基づくベクターを、適当な選別マーカーと共に使用することができる。

【0044】

発現ベクターを、適当な核酸コード配列が、適当な調節配列を含むベクター内に位置するように構築する。ここで、該調節配列に対する、該コード配列は、このコード配列が、該調節配列の「制御」の下で転写されるように、配置され、かつ配向されている。即ち、該コントロール配列において該DNA分子と結合しているRNAポリメラーゼは、該コード配列を転写する。幾つの場合において、該配列を修飾して、これを、適当な配向で、該コントロール配列に結合できることが必要である。即ち、該読み取り枠を維持することが必要

であり得る。

該コントロール配列又は他の調節配列を、ベクター内に挿入する前に、該核酸コード配列と連結することができる。あるいはまた、該コード配列は、既に該コントロール配列及び適当な制限サイトを含んでいる発現ベクターに、直接クローニングすることができる。

組換えポリペプチドを、長期に渡り、高収率で生産するためには、安定な発現が好ましい。例えば、対象とする該ポリペプチドを安定に発現する細胞系は、ウイルス起源の複製及び/又は内在性の発現要素及び選別可能なマーカー遺伝子を、同一の又は別々のベクター内に含むことのできる、発現ベクターを用いて形質転換することができる。該ベクターの導入に続いて、細胞を選別培地での培養に切り替える前に、これらを1-2日間に渡り、栄養強化培地で育成することができる。選別可能なマーカーを用いる目的は、選別に対する抵抗性を付与することであり、その存在は、該導入された配列を首尾よく発現する細胞の育成及び回収を可能とする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンを、この種の細胞にとって適当な、組織培養技術を用いて増殖させることができる。

10

【0045】

発現用の宿主として利用できる哺乳動物細胞系は、当分野において公知であり、アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection; ATCC)から入手できる、多くの不死化細胞系を包含し、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)、HeLa、ベビーハムスター腎臓(BHK)、サルの腎臓(COS)、C127、3T3、BHK、HEK 293、ボウエ(Bowes)黒色腫、及びヒト肝細胞癌腫(例えば、Hep G2)細胞及び多くの他の細胞系を含むが、これらに限定されない。

20

バキュロウイルス系において、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系用の物質は、市販品として、特にCA、サンジエゴのインビトロゲン(Invitrogen)社から、キット(マックスバック(MaxBac)キット)として入手できる。これらの技術は、一般に当業者には公知であり、Summers & Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555 (1987)に十分に記載されている。この系において使用するのに特に適した宿主細胞は、昆虫細胞、例えばドロソフィラ(Drosophila) S2及びスポドプテラ(Spodoptera) Sf9細胞である。

当分野において公知の、多くの植物細胞培養物及び全植物遺伝子発現系がある。適当な植物細胞遺伝子発現系の例は、米国特許第5,693,506号、同第5,659,122号及び同第5,608,143号に記載されているものを包含する。植物細胞培養物中の遺伝子発現系の更なる例は、Zenk, Phytochemistry, 1991, 30:3861-3863に記載されている。

30

【0046】

特に、プロトプラストを単離し、かつ培養して全再生植物を与えることのできる、全ての植物を使用することができ、従って全植物を回収することができ、これは該伝達された遺伝子を含む。実際に、全ての植物は、培養細胞又は組織から再生することができる。サトウキビ、サトウダイコン、綿、果実及び他の樹木、マメ科植物及び野菜の主な種の全てを含むが、これらに制限されない。

特に好ましいバクテリア宿主細胞の例は、ストレプトコッカス(streptococci)、スタフィロコッカス(staphylococci)、E.コリ(E. coli)、ストレプトミセス(Streptomyces)、及びバチルスズブチリス(Bacillus subtilis)細胞を包含する。

真菌発現用に特に適した宿主細胞の例は、酵母細胞(例えば、S.セレビスシアエ(S. cerevisiae))及びアスペルギルス(Aspergillus)細胞を含む。

40

形質転換細胞系を回収するのに使用できる、多数の選別系が、当分野において公知である。その例は、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ(Wigler, M.等, Cell, 1977, 11:223-32)及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy, I.等, Cell, 1980, 22:817-23)遺伝子を含み、これらは夫々、 tk^- 又は $aprt^+$ 細胞において使用できる。また、代謝拮抗物質、抗生物質又は除草剤耐性を、選別用の基礎として使用することができ、例えばメトトレキセートに対する耐性を付与する、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)(Wigler, M.等, Proc. Natl. Acad. Sci., 1980, 77:3567-70); アミノグリコシドネオマイシン及びG-418に対する耐性を付与する、 npt (Colbere-Garapin, F.等, J. Mol. Biol., 1981, 150:1-14); 及び夫々クロルスルフロン(Chlorsulfuron)及びホスフィントリシン(phosphinotr

50

icin)アセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与するals又はpatである。更なる選別可能な遺伝子が記載されており、その例は、当業者には明らかであろう。

【0047】

マーカー遺伝子発現の有無は、対象とする遺伝子も存在し、その存在及び発現を、確認する必要があることを示唆している。例えば、関連する配列が、マーカー遺伝子配列内に挿入されている場合、この適当な配列を含む形質転換細胞は、マーカー遺伝子機能が無いことによって同定できる。あるいはまた、マーカー遺伝子が、単一のプロモータの制御の下で、本発明のポリペプチドをコードする配列と、縦列状態で配置することができる。誘導又は選別に応答する、このマーカー遺伝子の発現は、通常該縦列遺伝子の発現をも示す。

10

あるいはまた、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含み、また該ポリペプチドを発現する宿主細胞は、当業者には公知の様々な手順で同定できる。これらの手順は、DNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーション、及びタンパク質バイオアッセイ、例えば蛍光活性化細胞選別(FACS)、又はイムノアッセイ技術(例えば、酵素結合イムノソルベントアッセイ[ELISA]及びラジオイムノアッセイ[RIA])を含むが、これらに限定されず、これらは、膜、溶液又はチップを基本とする、核酸又はタンパク質の検出及び/又は定量用の技術を包含する(Hampton, R.等, 血清学的方法(Serological Methods), 研究室用マニュアル(a Laboratory Manual), APS Press, MN、セントポール及びMaddox, D.E.等, J. Exp. Med., 1983, 158:1211-1216を参照のこと)。

【0048】

広範囲に渡る標識及び複合化技術が当業者には公知であり、また様々な核酸及びアミノ酸アッセイにおいて利用できる。本発明のポリペプチドをコードする核酸分子と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又はPCRプローブを製造するための手段は、オリゴ標識化(oligolabelling)、ニックトランスレーション、末端標識、又は標識したポリヌクレオチドを使用するPCR増幅を包含する。あるいはまた、本発明のポリペプチドをコードする配列は、mRNAプローブを製造するために、ベクター中にクローニングすることができる。このようなベクターは当業者において公知であり、市販品として入手可能であり、またインビトロにて、適当なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3、又はSP6及び標識されたヌクレオチドの添加により、RNAプローブを合成するために利用できる。これらの手順は、様々な市販品として入手できるキット(ファルマーシア&アップジョン(MI、カラマゾー); プロメガ(WI、マディソン); 及びU.S. バイオケミカル社(U.S. Bioc hemical Corp.) (クリーブランド、OH)を用いて、実施することができる。

20

30

欠失を容易にするために使用できる、適当なりポータ分子又はラベルは、放射性核種、酵素及び蛍光性物質、化学発光物質又は色素原物質並びに基質、補助因子、阻害剤、磁性粒子等を含む。

本発明による核酸分子は、またトランスジェニック動物、特に齧歯目の動物を創造するのに使用することができる。このようなトランスジェニック動物は、本発明の更なる局面を構成する。これは、体細胞の変性により、あるいは生殖系列療法(germ line therapy)によって局所的に行って、遺伝性の修飾を組み込むことができる。このようなトランスジェニック動物は、本発明のポリペプチドのモジュレータとして効果的な薬物分子に対する、動物モデルの生成において、特に有用であり得る。

40

【0049】

該ポリペプチドは、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、及びレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって、組換え細胞培養物から回収し、かつ精製することができる。精製のためには、高性能液体クロマトグラフィーが特に有用である。該ポリペプチドが、その単離及び/又は生成中に変性する場合には、その活性な立体配座を再生するために、タンパク質再生用の周知の技術を利用することができる。

50

また、特殊なベクター構造を使用して、所望の如く、本発明のポリペプチドをコードする配列と、可溶性のタンパク質の精製を容易にするであろう、ポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列とを結合することにより、タンパク質の精製を簡略化することができる。このような精製を簡略化するドメインの例は、金属キレート化ペプチド、例えば固定化金属上での精製を可能とするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能とするプロテインAドメイン、及びFLAGS/アフィニティー精製システム(WA、シアトルのイムネックス社(Immunex Corp.))において使用されるドメインを包含する。開裂可能なリンカー配列、例えばファクタXA又はエンテロキナーゼ(CA、サンジエゴのインビトロゲン社)に対して特異的なものの、該精製ドメインと本発明のポリペプチドとの間への挿入は、精製を容易化する目的で利用できる。このような発現ベクターの一つは、本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質の発現のために準備する。該融合タンパク質は、チオレドキシシン又はエンテロキナーゼ開裂サイトよりも先行する、幾つかのヒスチジン残基と融合している。これらのヒスチジン残基は、IMAC(Porath, J.等, Prot. Exp. Purif., 1992, 3:263-281に記載されているような、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)による精製を簡略化するが、チオレドキシシン又はエンテロキナーゼ開裂サイトは、該融合タンパク質から該ポリペプチドを精製するための手段を与える。融合タンパク質を含有するベクターに関する議論は、Kroll, D.J.等(DNA Cell Biol., 1993, 12:441-453)によって与えられている。

【0050】

該ポリペプチドを、スクリーニングアッセイにおいて使用する目的で発現させる場合には、一般に、これを発現する宿主細胞の表面において製造することが好ましい。この点に関連して、該宿主細胞は、例えば蛍光活性化細胞分別(FACS)又はイムノアフィニティー技術を用いて、該スクリーニングアッセイで使用する前に収穫することができる。該ポリペプチドが該培地中に分泌される場合、該培地を回収して、発現された該ポリペプチドを回収し、かつ精製することができる。ポリペプチドが細胞内で製造される場合、該ポリペプチドを回収するに先立って、まず該細胞を溶解する必要がある。

本発明のポリペプチドは、様々な薬物スクリーニング技術の何れかにおいて、化合物のライブラリーをスクリーニングするために使用することができる。このような化合物は、該遺伝子の発現レベル又は本発明のポリペプチドの活性レベルを、活性化(活発化)又は阻害(拮抗、相殺)することができ、また本発明の更なる局面を構成する。好ましい化合物は、本発明の第一局面のポリペプチドをコードする、天然遺伝子の発現を変更し、あるいは本発明の第一局面のポリペプチドの活性を調節するのに有効である。

アゴニスト又はアンタゴニスト化合物は、例えば細胞、細胞を含まない処方物、化学ライブラリー又は天然生成物の混合物から単離することができる。これらのアゴニスト又はアンタゴニストは、天然又は変性基質、リガンド、酵素、レセプター、又は構造的又は機能的擬似物質であり得る。このようなスクリーニング技術に関する適当な概説に関しては、Coligan等, Current Protocols in Immunology, 1991, 1(2):第5章を参照のこと。

【0051】

高い可能性で良好なアンタゴニストであると考えられる化合物は、結合した際に、本発明のポリペプチドの生物学的な効果を誘発することなしに、該ポリペプチドと結合する分子である。有力なアンタゴニストは、小さな有機分子、ペプチド、ポリペプチド、及び本発明のポリペプチドと結合して、その活性を阻害し、もしくは消滅させる抗体を包含する。このように、該ポリペプチドの正常な細胞結合分子との結合を、阻害することができ、結果的に該ポリペプチドの正常な生物学的活性が阻止される。

このようなスクリーニング技術において使用される本発明のポリペプチドは、溶液中で遊離状態とし、固体担体に固定し、細胞表面上に担持させ、又は細胞内に配置させることができる。一般に、このようなスクリーニング手順は、該ポリペプチドを発現する適当な細胞又は細胞膜の使用を含み、該ポリペプチドは、結合、又は機能的応答の刺激又は阻害を観察するためのテスト化合物と接触される。該テスト化合物と接触状態にある、該細胞の該機能的な応答を、次に該テスト化合物と接触していないコントロール細胞とを比較す

る。このようなアッセイは、適当な検出系を用いて、該テスト化合物が、該ポリペプチドの活性化による、シグナルの発生を結果するか否かを評価することを可能とする。活性化の阻害剤は、一般に既知のアゴニストの存在下で検定され、また該テスト化合物の存在下における、該アゴニストによって活性化に及ぼされる効果が、観測される。

【0052】

ここに記載したアッセイタイプにおいて検出可能なシグナルを発生させる方法は当業者には公知であろう。具体的な例は、GAL4 DNA結合ドメインと融合されている本発明のポリペプチド（または標的との結合に必要なフラグメント）を発現する構築物を細胞に、レポータープラスミドと一緒に同時トランスフェクトすることである（レポータープラスミドの例はpFR-Luc（Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands）である）。この特定のプラスミドは、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を制御するGAL4結合部位が縦並びに5つ繰り返されてある合成プロモーターを含んでいる。潜在的標的又はリガンドが細胞に添加されるとき、前記はGAL4-ポリペプチド融合物と結合し、ルシフェラーゼ遺伝子の転写を誘発する。ルシフェラーゼ発現レベルは、化学発光読み取り装置を用いその活性によってモニターすることができる（例えば以下を参照されたい：Lehman et al. JBC 270: 12953, 1995; Pawar et al. JBC, 277:39243, 2002）。

本発明のポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定するための、更に好ましい方法は、以下の諸工程を含む：

- (a) 標識又は非標識化合物を任意の固相（例えばビーズ、プレート、マトリックス支持体、チップ）に固定した該ポリペプチドと接触させ、標識又は化合物それ自体の存在を測定することによって化合物を検出する工程、又は
- (b) 該ポリペプチドをその表面上に発現する細胞を、該ポリペプチドとの結合を可能とする条件の下で、スクリーニングすべき化合物と接触させる工程、ここで該ポリペプチドは、これに対するある化合物の結合に応答して、検出可能なシグナルを発生することのできる、第二の成分と結合している；及び
- (c) 該化合物と該ポリペプチドとの相互作用により発生するシグナルのレベルを、該化合物が存在しない場合のシグナルレベルと比較することにより、該化合物が該ポリペプチドと結合し、かつ活性化又は阻害するか否かを決定する工程。

例えば、ペプチドのコアクチベーターの存在下で該ポリペプチドと結合したリガンドのFRET検出のような方法（Norris et al. Science 285: 744, 1999）を用いることも可能であろう。

更に好ましい態様において、上記した一般的な方法は、標識された又は標識されていない、該ポリペプチドに対するリガンドの存在下で、アゴニスト又はアンタゴニストを同定する工程を更に含む。

【0053】

本発明のポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定するための、別の態様は、以下の工程を含む：

該ポリペプチドとの結合を可能とする条件の下で、候補化合物の存在下で、表面に本発明のポリペプチドを持つ細胞、又はこのようなポリペプチドを含む細胞膜と、リガンドとの結合の阻害を測定する工程、及び該ポリペプチドと結合したリガンドの量を測定する工程。リガンド結合量を低下することのできる化合物は、アゴニスト又はアンタゴニストであると考えられる。好ましくは、リガンドは標識されている。

より具体的には、ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト化合物をスクリーニングする方法は、以下の諸工程を含む：

- (a) 標識したリガンドと、任意の固形支持体若しくは細胞表面の本発明のポリペプチド、又は本発明のポリペプチドを含有する細胞膜と共にインキュベートする工程；
- (b) 該固形支持体、該全細胞又は該細胞膜上のポリペプチドと結合した、標識リガンドの量を測定する工程；
- (c) 標識されたりガンドと、上記工程(a)の該固形支持体、該全細胞又は該細胞膜上の固定されたポリペプチドとの混合物に、候補化合物を添加し、かつ得られる混合物を平衡状

態にする工程；

(d) 該工程(c)の完了後、該固定ポリペプチド又は全細胞又は該細胞膜と結合した標識リガンドの量を測定する工程；及び

(e) 上記工程(b)及び(d)において結合した、該標識リガンドにおける差異を比較する工程。結果的に、該工程(d)における結合量に減少を生じた該化合物が、アゴニスト又はアンタゴニストであると考えられる。

【0054】

該ポリペプチドは、上記アッセイにおいて、用量依存型の様式で、多様な生理学的及び病学的プロセスを調節することが見出されえる。従って、本発明のポリペプチドの「機能的な等価物」は、上記アッセイにおいて、用量依存型の様式で、同じ調節活性の何れかを呈する、ポリペプチドを含む。用量依存型の活性の程度は、本発明のポリペプチドのものと同様である必要はないが、好ましくは、該「機能的な等価物」は、本発明のポリペプチドと比較した場合に、所定の活性に関するアッセイにおいて、実質的に同様な用量依存性を示すであろう。

上記態様の幾つかにおいて、簡単な結合アッセイを使用することができ、ここで該ポリペプチドを担持する表面に対するテスト化合物の結合性は、該テスト化合物に直接又は間接的に結合した標識によって、あるいは標識された競合物質との競合を含むアッセイにおいて検出される。他の態様では、競合的薬物スクリーニングアッセイを利用することができ、ここでは、該ポリペプチドを結合できる中和抗体が、結合に関して、テスト化合物と特異的に競合する。このように、該抗体は、該ポリペプチドに対する特異的な結合アフィニティを持つ、任意の化合物の存在を検出するのに使用できる。

【0055】

また、細胞内での該ポリペプチドをコードするmRNAの製造に及ぼす、添加したテスト化合物の効果を検出するように、アッセイを設計することも可能である。例えば、モノクローナル又はポリクローナル抗体を用いて、当分野において公知の標準的な方法によって、分泌された又は細胞-結合レベルを測定するように、ELISAを構成することができ、またこれを、適当に操作された細胞又は組織による、ポリペプチドの製造を阻害又は増強することのできる化合物を探索するために使用できる。次いで、該ポリペプチドと該テストすべき化合物との間の結合複合体の形成を、測定することができる。

さらにまた本発明に含まれるアッセイ方法は、過剰発現または除去アッセイで本発明の遺伝子及びポリペプチドを必要とするものである。このようなアッセイは、これら遺伝子/ポリペプチドの細胞内レベルの操作及び該操作された細胞の生理学に対するこの操作事象の影響の判定を必要とする。例えばこのような実験は、特定の遺伝子/ポリペプチドが関与するシグナリング及び代謝経路の詳細を明らかにし、さらに研究対象のポリペプチドが相互作用するポリペプチドの同定に関する情報をもたらす、さらに関連する遺伝子及びタンパク質を調節する方法についての手がかりを提供する。

使用可能なもう一つの薬物スクリーニング技術は、対象とするポリペプチドに対する適当な結合アフィニティを持つ化合物の高いスクリーニング能力を与える(国際特許出願W 0 84/03564を参照)。この方法では、多数の異なる小さなテスト化合物を、固体基質上に合成し、次いでこれらを本発明のポリペプチドと反応させ、洗浄することができる。該ポリペプチドを固定化する一つの方法は、非-中性抗体を用いることである。次いで、結合したポリペプチドを、当分野において周知の方法を用いて、検出することができる。また、生成したポリペプチドを、プレート上に直接被覆して、上記の薬物スクリーニング技術で使用することも可能である。

【0056】

本発明のポリペプチドは、当分野において公知の、標準的なレセプター結合技術を用いて、膜-結合した又は可溶性レセプターを同定するために使用でき、該結合技術は、例えばリガンド結合及び架橋アッセイであり、そこでは、該ポリペプチドは、放射性同位元素で標識されており、あるいはその検出又は生成を簡単化する、ペプチド配列と融合されており、また該ポリペプチドは、推定上のレセプターの源(例えば、細胞、細胞膜、細胞上

10

20

30

40

50

澄み、組織抽出物、又は体液)と共にインキュベートされる。この結合の効力は、生物物理的な技術、例えば表面プラズモンレゾナンス及びスペクトル分析を用いて測定できる。結合アッセイは、該レセプターの精製及びクローニングのために利用できるが、該ポリペプチドとそのレセプターとの結合と競合する、該ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストを同定することもできる。スクリーニングアッセイを実施するための標準的な方法は、当分野において十分に理解されている。

本発明は、また上記のようなアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質、酵素を同定する方法において有用な、スクリーニングキットをも含む。

本発明は、これらのアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質及び酵素、並びに上記方法によって発見された本発明のポリペプチドの活性又は抗原性を変調する他の化合物をも包含する。

本発明は、また本発明のポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物を、適当な製薬上の担体と共に含む薬理組成物をも提供する。これら組成物は、治療薬又は診断用の試薬として、ワクチンとして、又は以下において詳細に概説するように、他の免疫原性組成物として適したものであり得る。

【0057】

本明細書で使用する用語によれば、ポリペプチド、核酸、リガンド又は化合物[X]を含む組成物は、この組成物の全量[X+Y] (ここで、Yは不純物である)に対して少なくとも85質量%がXである場合には、不純物(Y)を「実質的に含まない」ものである。好ましくは、Xは該組成物全重量[X+Y]の少なくとも約90質量%、より好ましくは少なくとも約95%、98

%、又は99質量%でありさえする。
これら薬理組成物は、好ましくは治療上有効な量の、本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンド又は化合物を含むべきである。ここで使用する用語「治療上有効な量」とは、標的とする疾患又は状態を治療し、改善し又は予防するに要する、あるいは検出可能な治療又は予防効果を示すのに要する治療薬の量を意味する。任意の化合物に対して、治療上有効な用量は、初めに例えば腫瘍細胞の細胞培養アッセイ、通常マウス、ウサギ、イヌ又はブタである動物モデルにおいて見積もることができる。該動物モデルは、また適当な濃度範囲又は投与経路を決定するために使用することも可能である。次いで、このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量及び投与経路を決定することができる。

【0058】

ヒトを対象とする際の、正確な有効量は、疾患状態の重篤度、該対象の一般的な健康状態、該対象の年齢、体重及び性別、食事、投与時間とその頻度、薬物の組合せ、反応に対する感受性及び治療に対する寛容度/応答性に依存するであろう。この量は、ルーチン実験により決定することができ、また臨床医の判断の範囲内にある。一般に、有効投与量は、0.01mg/kg~50mg/kgなる範囲、好ましくは0.05mg/kg~10mg/kgなる範囲内にある。組成物は、個別に患者に投与することができ、あるいは他の薬剤、薬物又はホルモンとの組合せで投与することができる。

薬理組成物は、また治療薬の投与のために、製薬上許容される担体を含むこともできる。このような担体は、抗体及び他のポリペプチド、遺伝子及び他の治療薬、例えばリポソームを含むが、該担体それ自体は、該組成物を受容れる個体にとって有害な抗体の製造を誘発することが無く、しかも不当に毒性を示すことなしに投与できるものであることを条件とする。適当な担体は、大きな、徐々に代謝される巨大分子、例えばタンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー及び不活化されたウイルス粒子であり得る。

ここでは、製薬上許容される塩、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等の無機酸の塩；及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等の有機酸との塩を使用することも可能である。製薬上許容される担体に関する十分な議論は、レミントンの製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(Mack Pub. Co. N.J. 1991)において入手できる。

【0059】

10

20

30

40

50

治療組成物における製薬上許容される担体は、更に水、塩水、グリセロール及びエタノール等の液体を含むこともできる。更に、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝物質等の補助的物質も、このような組成物に存在し得る。このような担体は、該薬理組成物を、患者に摂取させるために、錠剤、ピル、糖衣剤、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤、懸濁剤として処方することを可能とする。

一旦処方した後には、本発明の組成物は、対象に直接投与することができる。治療すべき対象は、動物であり得、特にヒトを治療の対象とすることができる。

本発明で使用する該薬理組成物は、あらゆる数の経路で、例えば経口、静脈内、筋肉内、動脈内、延髄内、鞘内、心室内、経皮(トランスデルマル(transdermal)又はトランスクタニラス(transcutaneous))(例えば、W098/20734を参照)、皮下、腹腔内、鼻内、経小腸、局所、舌下、腔内、又は直腸内投与手段を含む(これらに限定されない)経路で投与できる。遺伝子銃又はハイポスプレイを使用して、本発明の薬理組成物を投与することもできる。典型的には、これら治療組成物は、注射可能な、溶液又は懸濁液として、注射前に液状ビヒクルの溶液又は懸濁液とするのに適した、固体形状で調製できる。

この組成物の直接的な放出は、一般に注射、皮下、腹腔内、静脈内又は筋肉内投与によって達成され、あるいは組織の間隙空間に放出される。これら組成物は、また病巣に投与することも可能である。投薬による治療は、単一投与スケジュール又は多重投与スケジュールであり得る。

【0060】

本発明のポリペプチドの活性が、特定の疾患状態において顕著である場合、幾つかの方法を利用できる。その一つの方法は、上記のように、対象に、製薬上許容される担体と共に、阻害性化合物(アンタゴニスト)を投与することを含むが、その量は、例えばリガンド、基質、酵素、レセプターの結合を遮断することによって、あるいは第二のシグナルを阻害することによって、該ポリペプチドの機能を阻害し、結果的にこの異常な状態を軽減するのに有効なものである。好ましくは、このようなアンタゴニストは抗体である。最も好ましくは、このような抗体は、前に記載したように、その免疫原性を最小化するために、キメラ及び/又はヒト化されたものである。

もう一つの方法において、問題とする、リガンド、基質、酵素、レセプターに対する結合アフィニティーを維持する、該ポリペプチドの可溶性型を投与することができる。典型的には、該ポリペプチドは、関連する部分を保持しているフラグメントとして投与することもできる。

【0061】

別の方法において、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、発現遮断技術、例えば内部で生成される又は外部から投与された、アンチセンス核酸分子(上記のような)の使用により阻害することができる。遺伝子発現の変更は、該ポリペプチドをコードする遺伝子の調節領域(シグナル配列、プロモータ、エンハンサ及びイントロン)又はコントロール5'に対する、相補配列又はアンチセンス分子(DNA、RNA又はPNA)を設計することによって得ることができる。同様に、阻害は、「トリプルヘリックス」塩基対形成法を利用して達成できる。トリプルヘリックス対形成法は、この対形成が、ダブルヘリックスの、ポリメラーゼ、転写ファクタ又は調節分子の結合を受容れる十分な能力を阻害することから、有用である。トリプレックスDNAを用いる最近の治療における進歩は、文献に記載されている(Gee, J.E.等(1994) In: Huber, B.E. & B.I. Carr, 分子的及び免疫学的研究法(Molecular and Immunologic Approaches), フツラ(Futura)出版社NY, Mt.キスコ)。該相補配列及びアンチセンス分子は、また転写生成物の、リボソームに対する結合を阻害することにより、mRNAの翻訳を遮断するように設計することができる。このようなオリゴヌクレオチドを投与することができ、あるいはこれをインピボでの発現によりその場で生成することができる。

【0062】

更に、本発明のポリペプチドの発現は、そのコードmRNA配列に対して特異的なリボザイムを用いることにより阻害し得る。リボザイムは、触媒的に活性なRNAであり、これは天

10

20

30

40

50

然又は合成何れであっても良い(例えば、Usman, N.等, Curr. Opin. Struct. Biol., 1996, 6(4):527-33を参照のこと)。合成リボザイムは、選択された位置でmRNAを特異的に開裂するように設計して、該mRNAの機能的ポリペプチドへの翻訳を阻害することができる。リボザイムは、通常RNA分子において見られるように、天然リボースホスフェート骨格及び天然塩基を用いて合成することができる。あるいは、また、このリボザイムは、非-天然型骨格、例えば2'-O-メチルRNAを用いて合成し、リボヌクレアーゼによる分解から保護することができる、また修飾した塩基を含むことができる。

RNA分子を変性して、細胞内安定性を高め、かつ半減期を延長することが可能である。可能な変性は、該分子の5'及び/又は3'末端におけるフランキング配列の付加、又は該分子骨格内での、ホスホジエステル結合ではなく、寧ろホスホロチオエート又は2'-O-メチルの使用を含むが、これらに限定されない。この概念は、PNAの製造において固有のものであり、非-伝統的塩基、例えばイノシン、キューオシン(queosine)及びプトシン並びにアセチル-、メチル-、チオ-及び同様に修飾された形状にあるアデニン、シチジン、グアニン、チミン及び/又はウリジンを含めることによって、これらの分子全てに拡張できる。上記塩基は、内在性のエンドヌクレアーゼによって、容易に認識されるものではない。また、本発明のポリペプチドの過少発現及びその活性と関連した、異常な状態を処置するために、幾つかの方法を利用することができる。その一つは、対象に、治療的に有効な量の、該ポリペプチドを活性化する化合物、即ち上記したアゴニストを投与して、該異常な状態を軽減する工程を含む。あるいは、適当な製薬担体と組み合わせた、治療量の該ポリペプチドを投与して、ポリペプチドの関連する生理的なバランスを回復させることが可能である。

10

20

【0063】

遺伝子療法を利用して、該対象内における関連細胞による、該ポリペプチドの内的生産を行うことができる。欠陥遺伝子を、修正された治療用の遺伝子で置換することによって、該ポリペプチドの不適當な生産性を、永続的に処置する目的で、遺伝子療法を利用する。

本発明の遺伝子療法は、インビボ又はエクスピボ(ex vivo)にて実施できる。エクスピボ遺伝子療法は、患者細胞の単離及び精製、治療遺伝子の導入及び遺伝的に変更した細胞の患者への再度の導入を必要とする。逆に、インビボ遺伝子療法は、患者細胞の単離及び精製を必要としない。

30

該治療用遺伝子は、典型的に患者に投与するために「包装される」。遺伝子放出ビヒクルは、非-ウイルス性のビヒクル、例えばリポソーム、又は複製能力に乏しいウイルス、例えばBerkner, K.L., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1992, 158:39-66に記載されているようなアデノウイルス、又はMuzyczka, N., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1992, 158:97-129及び米国特許第5,252,479号に記載されているような、アデノ-関連ウイルス(AAV)ベクターであり得る。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を、複製能力に乏しいレトロウイルスベクター内で発現するように操作することができる。次いで、この発現構築物を単離し、該ポリペプチドをコードするRNAを含む、レトロウイルスプラスミドベクターで、形質導入したパッケージング細胞内に導入する。結果的に、該パッケージング細胞は、今や、対象とする遺伝子を含む感染ウイルス粒子を製造する。これらの産生細胞は、インビボで細胞を操作し、かつインビボで該ポリペプチドの発現を行うために、対象に投与することができる(遺伝子療法及び他の分子遺伝学的治療法(Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches),第20章(及びそこに引用されている文献)、ヒューマンモレキュラージェネティクス(Human Molecular Genetics)(1996), T. Strachan & A.P. Read, BIOSサイエンティフィック(Scientific)出版社)。

40

【0064】

他の方法は、該治療用の遺伝子が、直接血流中又は筋肉組織内に注射される、「裸のDNA」の投与である。

本発明のポリペプチド又は核酸分子が、疾患の原因薬剤となっている状況下では、本発

50

明は、これらをワクチンにおいて使用して、該疾患原因薬剤に対する抗体を生成する方法を提供する。

本発明のワクチンは、予防的(即ち、感染防止)又は治療的(即ち、感染後の疾患の治療)何れであっても良い。このようなワクチンは、免疫感作抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質又は核酸を、通常上記のような製薬上許容される担体と共に含有し、該担体は、それ自体、この組成物を受容れる個人に対して有害な抗体の生産を誘発しない、任意の担体を包含する。更に、これらの担体は、免疫刺激剤(アジュバント)として機能することもできる。その上、該抗原又は免疫原は、バクテリアトキソイド、例えばジフテリア、狂犬病、コレラ、H.ピロリ及び他の病原体由来のトキソイドと複合化することも可能である。

ポリペプチドは胃において分解される恐れがあるので、ポリペプチドを含むワクチンは、好ましくは腸管外(例えば、皮下、筋肉内、静脈内、又は皮内注射)投与される。腸管外投与に適した処方物は、水性及び非水性滅菌注射溶液を含み、これらは酸化防止剤、バッファ、静菌剤、レシピエントの血液に対して該処方物を等張性にする溶質を含むことができ、また水性及び非水性滅菌懸濁液をも含み、これらは懸濁剤又は増粘剤を含むことができる。

【0065】

本発明のワクチン処方物は、単位投与容器内又は多重投与容器内で調製することができる。例えば、封止されたアンプル及びバイアルを、凍結乾燥された状態で保存ことができ、これらは、使用の直前に無菌液状担体の添加のみを必要とする。投与量は、該ワクチンの特異的な活性に依存し、また容易にルーチン実験により決定できる。

本発明によるポリペプチドと結合する抗体の遺伝子的放出も、国際特許出願W098/55607に記載されているように、効果的である。

ジェット注入(jet injection)と呼ばれる技術(例えば、www.powderject.comを参照のこと)も、ワクチン組成物の処方において有用である。

予防接種に関する多くの適当な方法及びワクチン放出系が、国際特許出願W000・29428に記載されている。

本発明は、また本発明による核酸分子の、診断用試薬としての使用にも関連する。機能不全と関連する本発明の核酸分子によって特徴付けられる遺伝子の、突然変異型の検出は、診断手段をもたらし、この手段は、又は該遺伝子の過少発現、過剰発現又は変更された空間的又は時間的な発現に起因する、疾患又は疾患に対する感受性の診断に追加し、あるいはこれを定義することを可能とする。遺伝子に突然変異を含む個体は、様々な技術で決定される、DNAレベルによって検出できる。

【0066】

診断用の核酸分子は、対象の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検又は剖検材料から得ることができる。該ゲノムDNAは、検出のために直接使用することができ、また分析に先立って、PCR、リガーゼ連鎖反応(LCR)、ストランド置換増幅(SDA)、又は他の増幅技術(Saiki等、Nature, 1986, 324:163-166; Bej等、Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol., 1991, 26:301-334; Birkenmeyer等、J. Virol. Meth., 1991, 35:117-126; Van Brunt, J., Bio/Technology, 1990, 8:291-294を参照)を利用することにより、酵素を利用して増幅することができる。

一態様において、本発明のこの局面は、患者における疾患を診断する方法を提供し、この方法は、本発明によるポリペプチドをコードする天然遺伝子の発現レベルを評価する工程及びこの発現レベルと、コントロールレベルとを比較する工程を含み、ここで該コントロールレベルと異なる遺伝子発現レベルは、疾患存在の指標となる。この方法は以下のような諸工程を含むことができる：

- a) 該患者を由来とする組織のサンプルと、核酸プローブとを、本発明の核酸分子と該プローブとの間に、ハイブリッド複合体の形成を可能とするストリンジェント条件下で接触させる工程と、
- b) コントロールサンプルと該プローブとを、上記工程a)において使用したものと同一の条件下で接触させる工程と、

10

20

30

40

50

c) 該サンプルにおけるハイブリッド複合体の存在を検出する工程とを含み、ここで、該コントロールサンプルにおける該ハイブリッド複合体レベルとは異なる、該患者サンプルにおける該ハイブリッド複合体レベルの検出が、疾患の指標となる。

【0067】

本発明の更なる局面は、以下の様な諸工程を含む、診断法を包含する：

- a) 疾患につきテストすべき患者由来の組織を得る工程と、
- b) 該組織サンプルから、本発明の核酸分子を単離する工程と、
- c) 該核酸分子における、該疾患と関連する突然変異の存在を検出することにより、該患者を該疾患について診断する工程。

上記方法における核酸分子の検出を助けるために、例えばPCRを利用する増幅段階を含むことができる。

欠失及び挿入は、正常な遺伝子型と比較した際の、該増幅生成物のサイズにおける変化により検出できる。点突然変異は、増幅されたDNAと、本発明の標識したRNA、あるいはまた本発明の標識されたアンチセンスDNA配列とハイブリダイズさせることにより同定できる。完全に一致する配列は、RNase消化、又は溶融温度における差異を評価することによって、適合しない二重鎖から識別することができる。該患者における突然変異の有無は、DNAと、ハイブリッド二本鎖分子を形成するためのストリンジェント条件下で、このDNAとハイブリダイズする核酸プローブとを接触させることによって、検出することができる。ここで、該ハイブリッド二本鎖分子は、疾患と関連する突然変異と対応する任意の部分に、該核酸プローブストランドのハイブリダイズされていない部分を含み、また該DNAストランドの対応する部分における疾患関連突然変異の有無の指標として、該プローブストランドのハイブリダイズされていない部分の有無を検出する。

かかる診断は、出生前及び新生児のテストに対してさえも、極めて有用である。

【0068】

点突然変異及び基準遺伝子と「突然変異」遺伝子との間の他の配列差は、他の周知の技術、例えば直接的DNA配列決定又は一本鎖の配座多形性等により同定することができる (Orlita等, Genomics, 1989, 5:874-879を参照のこと)。例えば、配列決定プライマーを、二本鎖PCR生成物又は改良PCRによって生成された、一本鎖鋳型分子と共に使用することができる。この配列決定は、放射性標識されたヌクレオチドを使用した公知の手順により、又は蛍光性タグを用いた自動配列決定手順によって行われる。クローニングされたDNAセグメントを、特定のDNAセグメントを検出するためのプローブとして使用することもできる。この方法の感度は、PCRと組み合わせた場合、大幅に高められる。更に、点突然変異及び他の配列上の変動、例えば多形性は、上記のようにして、例えば単一のヌクレオチドだけ異なる配列の、PCR増幅のために、対立遺伝子-特異的オリゴヌクレオチドを使用することによって、検出することができる。

DNA配列差は、変性剤の存在下又は不在下での、ゲル中でのDNAフラグメントの電気泳動移動度における変動により、あるいは直接的なDNA配列決定によって検出することも可能である (例えば、Myers等, Science, 1985, 230:1242)。特定の位置における配列変化も、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNase及びS1保護又は化学的開裂法によって明らかにすることができる (Cotton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 85:4397-4401を参照のこと)。

【0069】

公知のゲル電気泳動法及びDNA配列決定法に加えて、突然変異、例えばマイクロ欠失 (microdeletions)、異数性、転座、逆位をも、その場での分析によって検出することができる (例えば、Keller等, DNA Probes, 1993, 第2版, ストックトンプレス (Stockton Press), NY, NY, USAを参照のこと)、即ち細胞内のDNA又はRNA配列は、これらを単離し、及び/又は膜上に固定化する必要なしに、突然変異につき分析することができる。その場での蛍光ハイブリダイゼーション (FISH) は、現時点において最も一般的に利用される方法であり、またFISHに関する多くの概説が提出されている (例えば、Tranchuck等, Science, 1990, 250:559-562及びTrask等, Trends, Genet., 1991, 7:149-154を参照のこと)。

10

20

30

40

50

本発明のもう一つの態様では、本発明による核酸分子を含む、オリゴヌクレオチドのアレイを、遺伝的変異、突然変異及び多形性を効果的にスクリーニングするために、構築することができる。アレイ技術は周知であり、一般的な応用性を有し、また遺伝子発現、遺伝子結合、及び遺伝子の変異性を包含する、分子遺伝学における様々な問題点を扱う上で利用することができる(例えば、M. Chee等, Science, 1996, 274:610-613を参照のこと)。

【0070】

一態様において、該アレイは、PCT出願W095/11995(Chee等); Lockhart, D.J.等, Nat. Biotech., 1996, 14:1675-1680;及びSchena, M.等, Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, 93:10614-10619に記載されている方法に従って、製造し、かつ使用される。オリゴヌクレオチド対は、2~1,000,000以上なる範囲であり得る。これらオリゴマーは、光-誘発科学的方法を利用して、基質上で、指定された場所で合成される。該基質は、紙、ナイロン、又は他の型の膜、フィルタ、チップ、ガラススライド又は任意の他の適当な固体支持体であり得る。別の局面では、PCT出願W095/25116(Baldeschweiler等)に記載されているように、化学的なカップリング手順及びインクジェット塗布装置を用いて、該基質の表面上にオリゴヌクレオチドを合成することができる。別の態様では、ドット(又はスロット)プロットに類似する、「グリッド状」のアレイを使用して、cDNAフラグメント又はオリゴヌクレオチドを配置させ、かつこれと基質表面とを排気系、熱、UV、機械的又は化学的結合手順を用いて、結合することができる。上記のようなアレイは、手作業で、又は利用可能なデバイス(スロットプロット又はドットプロット装置)、材料(任意の適当な固体支持体)、及び装置(ロボット装置を含む)を利用して製造でき、また8、24、96、384、1536又は6144個のオリゴヌクレオチド、あるいは2~1,000,000以上なる範囲内の任意の数のオリゴヌクレオチドを含むことができ、このような数のオリゴヌクレオチドは、市販品として入手できる装置の効果的な使用にとって適している。

10

20

【0071】

上で論じた方法に加えて、疾患は、対象由来のサンプルから、ポリペプチド又はRNAレベルの異常な増加又は減少を測定する工程を含む方法によって、診断することができる。発現における増大又は減少は、ポリヌクレオチドの定量のために、当分野において周知の何れかの方法、例えば核酸増幅、例えばPCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザンブロッティング及び他のハイブリダイゼーション法を利用して、RNAのレベルにつき測定できる。

30

宿主由来のサンプルにおける、本発明のポリペプチドのレベルを測定するために利用できるアッセイ技術は、当業者には周知であり、上において幾分詳しく論じた(ラジオイムノアッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタンブロット分析及びELISAアッセイを包含する)。本発明のこの局面は、診断法を提供するものであり、この方法は、以下の諸工程を含む：(a) 上記のリガンドと、生物学的サンプルとを、リガンド-ポリペプチド複合体を生成するのに適した条件下で接触させる工程、及び(b) 該複合体を検出する工程。

ポリペプチドレベルを測定するための、ELISA、RIA、及びFACS等のプロトコールは、付随的に、変更された又は異常なポリペプチド発現レベルに関する診断の基礎を与える。ポリペプチド発現の正常な又は標準的な値は、正常な哺乳動物の対象から採取した、体液又は細胞抽出物と、該ポリペプチドに対する抗体とを、複合体の形成に適した条件下で結合させることによって設定される。この標準的な複合体形成量は、様々な方法、例えば測光的手段により低了することができる。

40

【0072】

本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体は、該ポリペプチドの発現により特徴付けられる状態又は疾患の診断のために、あるいは本発明の該ポリペプチド、核酸分子、リガンド及び他の化合物で治療している患者を、監視するためのアッセイにおいて使用することができる。診断の目的にとって有用な抗体は、治療法に関連して上記したものと同様な方法で製造できる。該ポリペプチドに関する診断アッセイは、ヒト体液及び細胞又は組織の抽出物における該ポリペプチドを検出するために、抗体及び標識を使用する方法を含む。これらの抗体は、変性し又は変性せずに使用でき、またこれらを、共有結合的に又は

50

非-共有結合的にリポータ分子と結合することによって、標識することができる。当分野において公知の広範囲に及びリポータ分子を使用することができ、その幾つかは上に記載されている。

対象、コントロール及び生検処理した組織由来の疾患サンプル中で発現されたポリペプチドの量を、その標準値と比較する。該標準値と対象の値との間のズレは、疾患を診断するためのパラメータを設定する。診断アッセイは、ポリペプチドの存在、不在及び過剰発現間の識別、及び治療による介入があった際のポリペプチドレベルの調節を監視するために、利用することができる。このようなアッセイは、動物研究、臨床上の試み又は個々の患者に対する治療を監視する際に、特定の治療処置養生の効果を評価するのに使用することも可能である。

10

【0073】

本発明の診断用のキットは、以下のものを含むことができる：

- (a) 本発明の核酸分子；
- (b) 本発明のポリペプチド；又は
- (c) 本発明のリガンド。

本発明の一面において、診断キットは、ストリンジェント条件下で、本発明による核酸分子とハイブリッドを形成する核酸プローブを含む、第一の容器；該核酸分子を増幅するのに有用なプライマーを含む、第二の容器；及び疾患の診断を容易にするための、該プローブ及びプライマーの使用に関連する取扱説明書を含む。このキットは、更にハイブリダイズされていないRNAを消化するための試薬を収容した、第三の容器をも含むことができる。

20

本発明の別の局面においては、診断キットは、核酸分子のアレイを含み、その少なくとも一つは、本発明の核酸分子であり得る。

本発明のポリペプチドを検出するために、診断キットは、本発明のポリペプチドと結合する、1種又はそれ以上の抗体、及び該抗体と該ポリペプチドとの間の結合反応を検出するのに有用な試薬を含むことができる。

【0074】

このようなキットは、c1qドメイン含有タンパク質が関与している、疾患又は該疾患に罹り易さを診断する上で有用である。このような疾患には、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、遺伝的疾患、発育障害、神経系疾患、代謝障害、感染及び他の病的状態；特に免疫疾患、例えば自己免疫疾患、慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、全身性紅斑性狼瘡及び多発性硬化症、炎症性疾患、例えばアレルギー、鼻炎、結膜炎、糸球体腎炎、ブドウ膜炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、膵炎、消化系炎症、敗血症、内毒素ショック、敗血症性ショック、悪液質、筋肉痛、強直性脊椎炎、重症筋無力症、ウイルス感染後疲労症候群、肺疾患、呼吸窮迫症候群、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気道炎症、創傷治癒、子宮内膜症、皮膚疾患、ベーチェット病、新形成疾患（例えばメラノーマ、肉腫、腎腫瘍、大腸腫瘍）、血液疾患、骨髄増殖性疾患、ホジキン病、骨粗しょう症、肥満、糖尿病、痛風、心脈管疾患、再灌流障害、アテローム性硬化症、虚血性心疾患、心不全、卒中、肝疾患、エイズ、エイズ関連合併症、神経疾患、男性不妊症、老化及び感染（アムエバー感染、細菌感染及びウイルス感染を含む）、骨若しくは軟骨形成又は維持に関連する疾患、遺伝性疾患及び他の病的状態が含まれる。好ましくは、前記疾患は以下から選択される：自己免疫疾患、自己免疫内耳疾患、迷路炎、メニエール病及びメニエール症候群、外リンパ又は迷路フィステル、耳鳴、神経変性疾患、アミロイド症、アルツハイマー病、パーキンソン病、家族性痴呆、炎症、微生物疾患、細菌性疾患、ウイルス性疾患（HIV、HTLV又はMuLV感染）、SLE、糸球体腎炎、肥満、糖尿病、シュミット骨端線軟骨形成不全、角膜内皮異栄養症、後部多形性角膜異栄養症（PPCD）、フック内皮角膜異栄養症（FECD）、アテローム性硬化症、壊血病、癌、胃腸管支質腫瘍、骨肉腫、軟骨芽細胞腫、巨細胞腫瘍、脊椎骨端線形成不全日本人型（SMD）、骨形成不全、エーレルス-ダンロー症候群、頸部動脈切開に対する感受性、エーレルス-ダンロー症候群、大動脈動脈瘤、耳脊椎巨大骨端形成不全（otospondylomegaepiphyseal dysplasia）、聴力消失（聾）、バイセ

30

40

50

ンバッハー-ツヴァイミュラー (Weissenbacher-Zweymüller) 症候群、関節炎、骨若しくは骨格の疾患、晩発性網膜変性 (L-ORD)、年齢性黄斑変性 (AMD) 及び/又は失明。このようなキットはまた生殖器疾患 (不妊症を含む) の検出にも用いることができる。

本発明の種々の特徴及び実施態様は、INSP161ポリペプチドの具体的な引用を用いて実施例によって更に詳細に記述されるであろう。

内容の変更が本発明の範囲を逸脱することなく実施できることは理解されよう。

【0075】

実施例1: INSP161タンパク質のBLASTによる結果

INSP161ポリペプチド配列 (配列番号22) をタンパク質BLASTクエリー配列としてNCBIの非反復配列データベースで用いた。図1は、BLASTクエリーの第一位の結果を示している。第一位のヒットは全て内耳コラーゲン前駆体、オトリンに対してであり、この特別なc1qドメイン含有タンパク質が該ファミリーのコラーゲン系構成員の1つであることを示唆している。

10

【0076】

実施例2: INSP161シグナル配列

図2及び図4は、INSP161は、該タンパク質の開始部位にシグナルペプチドを所有することが予想されることを示している。図2のシグナルPのデータが明瞭に示しているように、該シグナルペプチド切断部位はINSP161の部分ポリペプチド配列の残基37と38の間に存在すると考えられる (H. Nielsen et al. 1997, Protein Engineering, 10:1-6; H. Nielsen and A. Krogh: Prediction of signal anchors by a hidden Markov model. In Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, California, pp. 122-130 (1998))。

20

【0077】

実施例3: INSP161ドメイン

図3のCDDの出力データはINSP161ポリペプチドにc1qドメインが存在することを示している。c1q及びコラーゲンドメインの存在は図4にも示されている。

【0078】

実施例4: INSP161のまた別の切断部位

ズブチリシン/ケキシナイソザイム-1 (SKI1) のための2つの切断部位がINSP161に検出された。該切断部位はINSP161の残基60と61の間、及び残基325と326の間に存在する (図7参照)。INSP161配列で検出されたモチーフは“KGLKP”及び“RGFKG”である。該ズブチリシン様前たんぱく質コンバーターゼは哺乳動物の神経細胞及び内分泌細胞で広く発現され、神経ペプチド及びペプチドホルモン前駆体の両者のタンパク分解性プロセッシングで重要な役割を果たす。

30

ズブチリシン様前タンパク質コンバーターゼの構成員は、潜在前駆体タンパク質をそれらの生物学的に活性な生成物へとプロセッシングする前タンパク質コンバーターゼである (以下の概論を参照されたい: Sheidah et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1999, 96(4): 1321-6)。切断により生じる3つの予想される生成物は図5に示されている (INSP161-A、INSP161-B及びINSP161-C)。INSP161-AはINSP161の残基60と61の間でのSKI1切断により生じる。INSP161-Aは残基64から270に及ぶコラーゲン領域及び残基277から400に及ぶc1qドメインを含む。INSP161-Bは、INSP161の残基60と61の間及び残基325と326の間でのSKI1の切断により生じる。INSP161-Bは残基64から265に及ぶコラーゲン領域を含む。INSP161-Cは、INSP161の残基325と326の間でのSKI1の切断により生じる。INSP161-Cは残基12から135に及ぶc1qドメインを含む。

40

種々の構成員が同定された。ズブチリシン/ケキシナイソザイム-1 (SKI-1) プロテアーゼは別個の機能ドメインを含む哺乳動物のズブチラーゼである。SKI-1の主要な基質の中にはとりわけ、コレステロールと脂肪酸のホメオスタシスを調節するステロール調節性エレメント結合タンパク質が存在する。他の基質には、転写因子-6を活性化するストレス応答因子、脳由来神経栄養因子、及びアレナウイルス科に属する感染性の高いウイルスの表面糖タンパク質 (Elagoz et al. 2002. J. Biol. Chem. 277(13):11265-75) が含まれ

50

る。前ホルモンをプロセッシングする酵母KEX2プロテアーゼは、細胞内の膜タンパク質として又は可溶性、分泌性エンドペプチダーゼとして作用することができる。該タンパク質は、アルファ因子及びキラーチシンのプロセッシングに要求される。PCSK1(前タンパク質コンバーターゼ1、NEC1)及びPCSK2(前タンパク質コンバーターゼ2、NEC2)はI型プロインスリンプロセッシング酵素であり、インスリンの生合成で中心的な役割を果たす。それらはまた、プロオピオメラノコルチン、プロレニン、プロエンケファリン、プロジノルフィン、プロソマトスタチン及びプロガストリンを切断することが知られている。PACE4(対形成塩基性アミノ酸切断系4、SPC4)はカルシウム依存セリンエンドプロテアーゼであり、前駆体タンパク質をそれらの対形成塩基性アミノ酸プロセッシング部位で切断することができる。その基質のいくつかは、形質転換増殖因子ベータ関連タンパク質、プロアルブミン、及びウィルブランド因子である。フリン(PACE、対形成塩基性アミノ酸切断酵素、膜結合レセプタータンパク質)は、多様な基質(プロパラタイロイドホルモン、形質転換増殖因子ベータ1前駆体、プロアルブミン、プロ-ベータ-セクレターゼ、膜1型マトリックスメタロプロテイナーゼ、前神経増殖因子のベータサブユニット及びウィルブランド因子)のプロセッシングに必要なセリンエンドプロテアーゼである。PC7(前タンパク質コンバーターゼズブチリシン/ケキシン7型)はPACEとPACE4と近縁である。このカルシウム依存セリンエンドプロテアーゼは、トランス-ゴルジネットワークで濃縮され、膜に結合して分泌されない。前記はプロアルブミンをプロセッシングすることができる。PC7及びフリンもまたHIVエンベローブ糖タンパク質gp160及びgp140の活性化に必要であると考えられている。

10

20

【0079】

実施例5：エキソンのアッセンブリーによる INSP161のクローニング

INSP161は、3つのエキソンに及ぶ470アミノ酸残基(1470bp)でコードされる完全長c1q含有タンパク質と予想される。前記の予想物には開始メチオニン、シグナル配列及び終止コドンが含まれる(図4)。c1qドメイン及びコラーゲン領域は図4に示されている。3つのコラーゲンドメインが同定され、前記はG-X-Yリピートの多数のコピー(67コピー)を含む。鎖の位置、最小限の変動性を示す残基及び全てのc1qドメイン含有配列で厳密に保存される残基が、分子間境界に必要とされる残基と同様にKishoreら(下記文献(Trends Immunology 2004, 25(10):551-561)の図3を参照されたい)によるc1qに関する概論から決定される。

30

INSP161タンパク質を生成するために以下を実施した：

- エキソン1、2及び3をPCRによってゲノムDNAから増幅させた(図6)。
- ゲル精製エキソンを混合して新しいPCR反応を実施して、再アッセンブリングしたDNAを増幅させた。
- INSP161コード配列に対応する完全長のPCR生成物(図4)をpCR4-TOP0クローニングベクター(Invitrogen)でサブクローニングした、

5.1 ゲノムDNAから INSP161をコードするエキソンのPCR増幅：

INSP161のエキソン1、2及び3を増幅するためにPCRプライマーを設計した(INSP161-AP1/INSP161-AP2、INSP161-A3/INSP161-AP4及びINSP161-AP5/INSP161-AP6、表1)。エキソン1のためのリバースプライマー(INSP161-AP2)は、INSP161のエキソン2とその5'末端に18bpのオーバーラップを有していた。エキソン2のフォワードプライマー(INSP161-AP3)は、INSP161のエキソン1とその5'末端に18bpのオーバーラップを有していた。エキソン2のためのリバースプライマー(INSP161-AP4)は、INSP161のエキソン3とその5'末端に18bpのオーバーラップを有していた。エキソン3のフォワードプライマー(INSP161-AP5)は、INSP161のエキソン2とその5'末端に18bpのオーバーラップを有していた。

40

INSP161のエキソン1を生成するために、PCR反応は最終容積50 μ Lで実施した。前記は、1 μ LのゲノムDNA(0.1 μ g/ μ L、Novagen Inc.)、1.5 μ Lの10mMのdNTP、1 μ LのMgSO₄(50mM、Invitrogen)、1.5 μ LのINSP161-AP1(10 μ M)、1.5 μ LのINSP161-AP2(10 μ M)、10 μ Lの10XのPfx緩衝液及び0.4 μ LのPfxポリメラーゼ(2.5U/ μ L、Invitrogen)を含んでいた。INSP161のエキソン2は、PCRプライマーINSP161-AP3及びINSP161-AP4を用い同じ方法

50

によって製造した。INSP161のエキソン3は、PCRプライマーINSP161-AP5及びINSP161-AP6を用い同じ方法によって製造した。サイクリングは、以下のようにプログラムしたMJリサーチDNAエンジンを用いて実施した：94 で5分；94 15秒、60 30秒及び68 1分の30サイクル；更68 で7分の伸長サイクル；及び4 の1維持サイクル。

エキソン1PCR生成物の期待されるサイズは42bpであった。エキソン2PCR生成物の期待されるサイズは126bpであった。エキソン3PCR生成物の期待されるサイズは932bpであった。PCR生成物は1.5%アガロースゲル(1X TAE)上で可視化し、正確なサイズの生成物をウィザードPCRプレップスDNA精製系(Wizard PCR Preps DNA Purification System; Promega)を用いてゲル精製し、30µLの水に溶出させて直接サブクロニングを実施した。

【0080】

5.2 エキソン1、2及び3をアッセンブリングしてINSP161のORFを作製する：

エキソン1、2及び3を以下を含む50µLのPCR反応物中でアッセンブリーさせた：5µLのゲル精製エキソン1、5µLのゲル精製エキソン2、5µLのゲル精製エキソン3、1XのプラチナムTaqハイフィデリティー(Platinum(商標)Taq High Fidelity(HiFi)緩衝液、2mMのMgSO₄、200µMのdNTP、0.2µMの各クロニングプライマー(INSP161-AP1及びINSP161-AP6)、及び1ユニットのプラチナムTaqハイフィデリティー(Platinum(商標)Taq High Fidelity)(HiFi)。サイクリングは、以下のようにプログラムしたMJリサーチDNAエンジンを用いて実施した：94 2分；94 30秒、50 30秒及び68 1分の30サイクル；94 30秒、55 30秒及び68 1分の25サイクル；続いて68 で8分の1サイクル及び4 の1維持サイクル。反応生成物は0.8%アガロースゲル(1X TAE)上で可視化し、正確な分子量(1410bp)のPCR生成物をウィザードPCRプレップスDNA精製系(Wizard PCR Preps DNA Purification System; Promega)を用いてゲルから精製し、30µLの水に溶出させてサブクロニングまで-20 で保存した。

5.3 PCR生成物のサブクロニング：

インビトロゲン社から購入したトポイソメラーゼI改変クロニングベクタ(pCR4-TOPO)で、製造業者によって指定された条件を使用してPCR生成物をサブクロニングした。簡単に説明すると、4µLのゲル精製PCR生成物を、室温にて15分間、1µLのTOPOベクター及び1µLの塩溶液と共にインキュベートした。次いで、この反応混合物を、以下のようにして大腸菌(E. coli)株TOP10(インビトロゲン)を形質転換した：ワンショット(One Shot)TOP10細胞のアリコート50µLを氷上で解凍し、2µLのTOPO反応液を添加した。この混合物を、氷上で15分間インキュベートし、次に42 にて正確に30秒間インキュベートすることによって、該混合物に熱ショックを与えた。サンプルを氷に戻し、250µLの加温したSOC培地(室温)を添加した。サンプルを、振とう(220rpm)しつつ37 にて1時間インキュベートした。次いで、この形質転換混合物を、アンピシリン(100µg/ml)を含むL-ブロス(LB)プレート上に置き、37 にて一夜インキュベートした。

5.4 コロニーPCR：

コロニーを、滅菌した爪楊枝を用いて、50µLの無菌水中に接種した。次に、この接種物の10µLアリコートを、以下を含む全反応体積20µL中でMJリサーチDNAエンジンを用いてPCRに付した：1Xのアンプリタック(AmpliTaq(商標))緩衝液、200µMのdNTP、20ピコモルのT7プライマー、20ピコモルのT3プライマー、1ユニットのアンプリタック(AmpliTaq(商標))DNAポリメラーゼ。サイクル条件は、以下の通りであった：94 にて2分間；94 にて30秒間、48 にて30秒間及び72 にて2分間の30サイクル。サンプルを更に分析する前に、4 に維持した(維持サイクル)。

PCR反応性生物を、1X TAEバッファー中で、1%アガロースゲル上で分析した。予想されたPCR生成物のサイズ(1410bpのcDNA+105bp(多重クロニングサイト又はMCSによる))を与えるコロニーを、アンピシリン(100µg/ml)を含む5mlのL-ブロス(LB)中で、37 にて一夜、振とう(220rpm)しつつ増殖させた。

【0081】

5.5 プラスミドDNAの製造及び配列決定：

ミニプレブ(Miniprep)プラスミドDNAを、バイオロボット(Biorobot)8000自動系(Qiag 50

10

20

30

40

en)又はウイザードプラスSVミニプレプス(Wizard Plus SV Minipreps)キット(プロメガ(Promega)カタログNo.1460)を用いて、その製造業者の指示に従って、5mlの培養液から製造した。プラスミドDNAは、80 μ lの滅菌水に溶出した。DNA濃度はスペクトラマックス(Spectramax)190分光光度計(Molecular Devices)を用いて測定した。プラスミドDNA(200-500ng)を、ビッグダイターミネータ装置(アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)カタログNo.4390246)を用いて、その製造業者の指示に従って、プライマーT7及びT3配列決定プライマー並びに遺伝子特異的プライマー、INSP161-SP1、INSP161-SP2、INSP161-AP1、INSP161-AP2、INSP161-AP3、INSP161-AP4、INSP161-AP5及びINSP161-AP6を用いて、DNA配列決定に付した。これらプライマーの配列は表1に示されている。配列決定反応生成物は、Dye-Exカラム(キアゲン)又はモンタージ(Montage)SEQ 96クリーンアッププレート(ミリポア(Millipore)カタログNo.LSKS09624)を用いて精製し、次いでアプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)3700配列決定装置で分析した。

配列決定分析により、該予測されたINSP161コード配列に対して100%の一致性を示す一つのクローンを同定した。このクローニングされたcDNAフラグメントの配列は図4に示されている。このクローニングされたPCR生成物のプラスミドマップはpCR4-TOP0-INSP161である。

【0082】

表1: INSP161のクローニング及び配列決定のためのプライマー

【表1】

プライマー	配列 (5'-3')
INSP161-AP1	ATG TAT ATA TTT TCC TAT TAT ATC TTT CTT CCA GCT TCA AAT ATG
INSP161-AP2	CAG CCT CTC CTT TAG GAC CTG GCT GTC CAG TCT CTC
INSP161-AP3	GAG AGA CTG GAC AGC CAG GTC CTA AAG GAG AGG CTG GAA
INSP161-AP4	CCT TAG GGC CAG GTT CAC CTT TCT CTC CTT TGT AGC
INSP161-AP5	GCT ACA AAG GAG AGA AAG GTG AAC CTG GCC CTA AGG GAG
INSP161-AP6	TGG TGA AAT TCC AGA AGT TTC CTC TGG GTA CAA
INSP161-SP1	CCT CGG CCT TGG ATT CTG TC
INSP161-SP2	AGG CTC CAA GGG AGA CAC AT
INSP161-SP3	TGG TGA AAT TCC AGA AGT TTC CTC TGG GTA CAA
INSP161-EX1	GCA GGC TTC GCC ACC ATG TAT ATA TTT TCC TAT TA
INSP161-EX2	<i>TG ATG GTG ATG GTG</i> ATG GTG ATG GTG ATG GTG TGG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG
pEAK12F	GCC AGC TTG GCA CTT GAT GT
pEAK12R	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG

【0083】

下線付き配列 = コザック配列

イタリック体配列 = Hisタグ

太字 = 隣接エキソンとのオーバーラップ

【0084】

実施例6：INSP161のための哺乳動物細胞発現ベクターの構築

プラスミドpCR4-TOPO-INSP161をPCR鋳型として使用し、ゲートウェイ (Gateway(商標)) クローニング法により、6HISタグをコードする3'配列をもつINSP161 ORF配列を含むpEAK12d及びpDEST12.2発現クローンを作製した。

6.1 インフレーム6HISタグ配列と融合した、ゲートウェイ相溶性INSP161 ORFの生成：

このゲートウェイクローニング法の第一段階は2段階PCR反応を必要とする。該反応は、その5'末端でattB1組換え部位及びコザック (Kozak)配列とフランキングし、さらにその3'末端でインフレーム (in frame)6ヒスチジン (6HIS)タグをコードする配列、終止コドン及びattB2組換え部位 (ゲートウェイ相溶性cDNA)とフランキングするINSP161のORFを生じる。最初のPCR反応液 (最終体積50 μ l)はそれぞれ以下を含む：1 μ l (30ng) のプラスミドpCR4-TOPO-INSP161、1.5 μ lのdNTPs(10mM)、10 μ lの10X Pfxポリメラーゼ緩衝液、1 μ lのMgSO₄ (50mM)、各0.5 μ lの遺伝子特異的プライマー (100 μ M) (INSP161-EX1及びINSP161-EX2)、10 μ lの10Xエンハンサ (EnhancerTM)溶液 (Invitrogen)及び0.5 μ lのプラチナム (Platinum) Pfx DNAポリメラーゼ (Invitrogen)を含む。このPCR反応は、95 $^{\circ}$ Cで2分間の最初の変性工程；引続き94 $^{\circ}$ Cにて15秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び68 $^{\circ}$ Cにて2分間の12サイクル；及び4 $^{\circ}$ Cの維持サイクルを用いて実施された。増幅生成物は、その製造業者の指示に従って、ウイザードPCRプレプスDNA精製システム (Wizard PCR Preps DNA Purification System)；プロメガ (Promega)社)を用いて直接精製し、50 μ lの滅菌水に回収した。

第二のPCR反応液 (最終体積50 μ l)は、10 μ lの精製されたPCR生成物、1.5 μ lのdNTPs(10 mM)、5 μ lの10X Pfxポリメラーゼ緩衝液、1 μ lのMgSO₄(50mM)、各0.5 μ lのゲートウェイ変換プライマー (100 μ M) (GCPフォワード及びGCPリバースプライマー)及び0.5 μ lのプラチナムPfx DNAポリメラーゼを含む。この第二PCR反応のための条件は、以下の通りであった：95 $^{\circ}$ Cにて1分間；94 $^{\circ}$ Cにて15秒間、50 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び68 $^{\circ}$ Cにて3分間の4サイクル；94 $^{\circ}$ Cにて15秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び68 $^{\circ}$ Cにて3分間の25サイクル；及びこれに続く4 $^{\circ}$ Cの維持サイクル。PCR混合物は、ウイザードPCRプレプスDNA精製システム (プロメガ)を、その製造業者の指示に従って使用して精製し、さらに50 μ lの滅菌水に回収した。生成物が予想された分子量 (1480bp)であることを実証するために、10 μ lアリコートをして1XのTAE緩衝液 (Invitrogen)中の0.8%アガロースゲルで可視化した。

【0085】

6.2 ゲートウェイ相溶性INSP161 ORFの、ゲートウェイエントリーベクターpDONR221及び発現ベクターpEAK12d及びpDEST12.2へのサブクローニング：

該ゲートウェイクローニング法の第二段階は、該ゲートウェイ改変PCR生成物の、以下のような、ゲートウェイエントリー (Gateway entry)ベクターpDONR221 (インビトロゲン)へのサブクローニングを必要とする：PCR2から得られた精製した生成物5 μ lを、1.5 μ lのpDONR221ベクター (0.1 μ g/ μ l)、2 μ lのBP緩衝液及び1.5 μ lのBPクローナーゼ (clonase) 酵素混合物 (インビトロゲン)と共に、最終体積10 μ lにてRTで1時間インキュベートした。この反応を、1 μ lのプロテイナーゼK (2 μ g/ μ l)の添加により停止させ、37 $^{\circ}$ Cにて更に10分間インキュベートした。この反応のアリコート (2 μ l)を用いて、以下のようにして大腸菌株TOP10 (Invitrogen)を形質転換した：50 μ lのワンショット (One Shot) TOP10細胞アリコートを氷上で融解し、2 μ lの反応混合物を加えた。該混合物を30分氷上でインキュベートし、続いて42 $^{\circ}$ Cで正確に30秒インキュベートすることによって熱ショックを与えた。サンプルを氷上に戻し、250 μ lの温SOC培養液 (室温)を添加した。サンプルを振盪 (220rpm)しながら37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。続いてこの形質転換混合物を、カナマイシン (40 μ g/mL)を含むL-ブロス (LB)プレートで平板培養して一夜37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。得られたコロニーのうち6つをQpix2コロニー採取ロボット (Genetix)を用いて1.3mLのT-ブロス (TB)にそれぞれ接種し、振盪 (220rpm)しながら37 $^{\circ}$ Cで一夜増殖させ、さらにキアプレップ (Qiaprep) バイオロボット8000システム (Qiagen)を上述のように用いてプラスミドミニプレップ (miniprep) DNAを調製した。プラスミドDNA (150 - 200ng)を、21M13及びM13Revプライマーを用い、ビッグライターミネータシステム (Applied Biosystems；カタログNo.4336919)で、その製造業者の指示に従ってDNA配列決定に付し

た。プライマー配列は表 1 に示されている。配列決定反応物は、モンタージ (Montage) SE Q 96 クリーンアッププレート (Millipore ; カタログ No. LSKS09624) を用いて精製し、次いでアプライドバイオシステムズ (Applied Biosystems) 3700 配列決定装置で分析した。

【 0 0 8 6 】

続いて正確な配列 (pENTR_INSP161-6HIS) を含むクローンのうちの1つのプラスミド溶出液 (2 μ L 又は約 150 ng) を組換え反応で用いた。前記反応は 1.5 μ L の pEAK12d ベクター又は pDEST12.2 ベクターのどちらか 1.5 μ L (0.1 μ g / μ L) 、 2 μ L の LR 緩衝液及び 1.5 μ L の LR クロナーゼ (Invitrogen) を最終体積 10 μ L 中に含んでいた。この混合物を RT で 1 時間インキュベートし、プロテイナーゼ K (2 μ g) の添加によって反応を停止させ、更に 10 分 37 でインキュベートした。この反応物のアリコート (2 μ L) を用いて大腸菌株 TOP10 (Invitrogen) を以下のようにして形質転換させた : 50 μ L のワンショット (One Shot) TOP10 細胞アリコートを氷上で融解し、2 μ L の反応混合物を加えた。該混合物を 30 分氷上でインキュベートし、続いて 42 で正確に 30 秒インキュベートすることによって熱ショックを与えた。サンプルを氷上に戻し、250 μ L の温 SOC 培養液 (室温) を添加した。サンプルを振盪 (220 rpm) しながらか 37 で 1 時間インキュベートした。続いてこの形質転換混合物を、アンピシリン (100 μ g / mL) を含む L-プロス (LB) プレートで平板培養して 37 で一夜インキュベートした。

キアプレップ (Qiaprep) バイオロボット 8000 システム (Qiagen) を用いて各ベクターでサブクロニングして得たコロニーのうち 6 つの培養の 5 mL からプラスミドミニプレップ (miniprep) DNA を調製した。pEAK12d ベクターのプラスミド DNA (200 - 500 ng) を、配列決定プライマー pEAK12F 及び pEAK12R 並びに遺伝子特異的プライマー INSP161-SP1、INSP161-SP2 及び INSP161-SP3 (表 1 及び図 4) を用いて、DNA 配列決定に付した。pDEST12.2 ベクターのプラスミド DNA (200 - 500 ng) を、配列決定プライマー 21M13 及び M13Rev 並びに遺伝子特異的プライマー INSP161-SP1、INSP161-SP2 及び INSP161-SP3 を用いて DNA 配列決定に付した。プライマー配列は表 1 に示されている。

CsCl グラディエントによって精製したマキシ-プレップ (maxi-prep) DNA を配列確認済みクローン (pEAK12d_INSP161-6HIS) の 500 mL 培養から文献に記載の方法 (J. Sambrook et al., 1989, in Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press) を用いて調製し、プラスミド DNA を滅菌水 (又は 10 mM の トリス-HCl (pH 8.5)) に 1 μ g / μ L の濃度で再懸濁させ、-20 で保存した。

配列確認済みクローン (pDEST12.2_INSP161-6HIS) の 500 mL 培養からエンドフリープラスミドメガキット (EndoFree Plasmid Mega kit ; Qiagen) を製造業者の指示に従いながら用いて、内毒素を含まないマキシ-プレップ (maxi-prep) DNA を調製した。精製プラスミド DNA を内毒素非含有 TE 緩衝液に少なくとも 3 μ g / μ L の最終濃度で再懸濁させ、-20 で保存した。

【 0 0 8 7 】

実施例 7 : 哺乳類細胞での機能的ゲノミクスの発現とクローニングされたヒスチジンタグ付加プラスミド pEAK12d_INSP161-6HIS の精製

エプスタイン-バーウイルス核内抗原を発現しているヒト胎児腎 293 細胞 (HEK293-EBNA, Invitrogen) を Ex-cell VPRO 血清非含有培養液に浮遊させて維持した (シードストック、維持培養液、JRH) 。 1 % の FCS を補充した 250 mL の FEME (DMEM / Ham's F-12 (1 : 1) 、 19 mM の HEPES、5 g / L の グルコース、7.5 mM の L-グルタミン、4 mL / L の ITS-X) (全て Invitrogen-Life Technologies) 培養液に 1×10^6 細胞 / mL の濃度で細胞を接種した。トランスフェクションミックスのために、500 μ g の DNA (pEAK12d_INSP161-6HIS) + 10 μ g の レポーター遺伝子 DNA を 50 mL の FEME 1% FCS で希釈する。続いて 1 mL の PEI (1 mg / L、Polysciences, USA) を添加する。このミックスを 10 分間室温でインキュベートする。10 分後に、該トランスフェクションミックスを細胞に添加し、この培養を 37 にて 90 分、インキュベータで維持する。最後にこの溶液に残りの 200 mL の FEME 1% FCS (非滅菌 DNA による汚染を防ぐために 2.5 mL の ペン-ストレップ (Pen-Strep) を含む) を注ぎ足す。トランスフェクション陽性の確認は、6 日目の定性的蛍光試験 (Axiovert 10 Zeiss) によって実施した。6 日目 (採集日) に、

上清 (500mL) を遠心し (4、400g)、固有の識別票をもつポットに入れた。

7.1 精製プロセス：

C-末端6Hisタグをもつ組換えタンパク質を含む500mLの培養液サンプルを1容の冷緩衝液A (50mMの NaH_2PO_4 ; 600mMの NaCl ; 8.7% (w/v) のグリセロール (pH7.5)) で最終容積1000mLに希釈した。該サンプルを0.22 μm の滅菌フィルターでろ過し (Millipore, 500mLフィルターユニット)、1リットルの滅菌した角型培養ビン (Nalgene) で4にて保存した。

精製は、自動サンプル添加装置 (Labomatic) に連結したヴィジョン (VISION) ワークステーション (Applied Biosystems) で実施した。精製方法は以下の2つの連続する工程を含む：Niイオンをチャージしたポロス (Poros) 20MCカラム (Applied Biosystems) (10 \times 50nm、3.93mL) での金属アフィニティークロマトグラフィー、その後のセファデックスG-25メジウム (Amersham Pharmacia) ゲルろ過カラム (1.0 \times 15cm) での緩衝液交換。

最初のクロマトグラフィー工程のために、金属アフィニティークラムを30カラム容積のEDTA溶液 (100mMのEDTA ; 1Mの NaCl ; pH8.0) で再生し、さらに以下のようにしてNiイオンを再チャージした：15カラム容積の100mMの NiSO_4 溶液で洗浄、10カラム容積の緩衝液Aで洗浄、続いて7カラム容積の緩衝液B (50mMの NaH_2PO_4 ; 600mMの NaCl ; 8.7% (w/v) のグリセロール ; 400mMイミダゾール (pH7.5)) で洗浄、最後に15カラム容積の15mMイミダゾール含有緩衝液Aで平衡化。ロボマチック (Labomatic) サンプル添加装置によりサンプルを200mLのサンプルループに移し、続いてNi金属アフィニティークラムに流速20mL/分で添加した。該添加工程を5回繰り返し、全サンプル (1000mL) をNiカラムに移した。続いて該カラムを12カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、その後28容積の20mMイミダゾール含有緩衝液Aで洗浄した。20mMのイミダゾール洗浄中に、緩やかに結合した夾雑タンパク質はカラムから溶出した。最後に組換えHisタグ付加タンパク質を10カラム容積の緩衝液Bにより流速2mL/分で溶出させ、該溶出タンパク質を2.7mL分画で採集した。

【0088】

第二のクロマトグラフィー工程のために、G-25ゲルろ過カラムを2mLの緩衝液D (1.137Mの NaCl ; 2.7mMの KCl ; 1.5mMの KH_2PO_4 ; 8mMの Na_2HPO_4 ; pH7.2) で再生し、その後4カラム容積の緩衝液C (137mMの NaCl ; 2.7mMの KCl ; 1.5mMの KH_2PO_4 ; 8mMの Na_2HPO_4 ; 20% (w/v) グリセロール ; pH7.4) で平衡化した。Ni-カラムから溶出したピーク分画はヴィジョン (VISION) に組み込まれているサンプル添加装置を介してセファデックスG-25カラムに自動的に添加され、該タンパク質は緩衝液Cで流速2mL/分で溶出された。脱塩したサンプルを2.7mLの分画に回収した。該分画を0.22 μm の滅菌遠心フィルター (Millipore) でろ過し、アリコートに小分けし、凍結して-80にて保存した。該サンプルのアリコートをSDS-PAGE (4-12%のNuPAGEゲル ; Novex) でクマシーブルー染色及び抗His抗体によるウェスタンブロットによって分析した。

NuPAGEゲルを0.1%クマシーブルーR250染色溶液 (30%メタノール、10%酢酸) 中で室温にて1時間染色し、続いて20%メタノール、7.5%酢酸でバックが透明になり、タンパク質バンドが明瞭に見えるようになるまで脱染した。

電気泳動の後で、該タンパク質をゲルからニトロセルロースメンブレンへ290mAで1時間4にて電氣的に移した。該メンブレンを緩衝液E中の5%粉乳で1時間室温にてブロックし、続いて、2.5%粉乳緩衝液E中の2種のウサギポリクローナル抗His抗体の混合物 (G-18及びH-15、各々0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Santa Cruz) とともに一夜4にてインキュベートした (緩衝液E : 137mMの NaCl ; 2.7mMの KCl ; 1.5mMの KH_2PO_4 ; 8mMの Na_2HPO_4 ; 0.1%トウイン20 ; pH7.4) 。室温で更に1時間インキュベートした後、該メンブレンを緩衝液E (3 \times 10分) で洗浄し、続いて、2.5%の粉乳を含む緩衝液Eで1/3000に希釈したHRP-結合抗ウサギ二次抗体 (DAKO, HRP 0399) とともに室温で2時間インキュベートした。緩衝液E (3 \times 10分) で洗浄した後、該メンブレンをECLキット (Amersham) で1分処理した。続いて該メンブレンでハイパーフィルム (Hyperfilm) を感光させ、該フィルムを現像し、ウェスタンブロット像を視覚的に分析した。

【0089】

INSP161 特定配列のリスト：

10

20

30

40

50

配列番号： 1 (INSP161 成熟ヌクレオチド配列)

1 AAGACCACAC CACATACCAA ATTTACGAAG AAATCTGAGG AAAGAGAGAT
 51 GCCAAAGGGT CTAAAGCCAT CCAGTGGCCC ACCTCCAGAA GAAGAAGAAA
 101 CCCTCTTCAC AGAAATGGCT GAAATGGCAG AACCAATTAC CAAACCCTCG
 151 GCCTTGGATT CTGTCTTTGG CACTGCCACT CTCTCTCCCT TTGAAAACCT
 201 CACTCTTGAC CCAGCTGATT TCTTTTTGAA TTGTTGTGAT TGTTGTTTAC
 251 CTGTACCCGG GCAGAAAGGA GAACCTGGAG AGACTGGACA GCCAGGTCCT
 301 AAAGGAGAGG CTGGAAATTT GGGGATCCCA GGGCCACCAG GAGTTGTTGG
 351 GCCCAAGGC CCTAGAGGCT ACAAAGGAGA GAAAGGTGAA CCTGGCCCTA
 401 AGGGAGATAA AGGAAACATT GGTTTGGGAG GAGTGAAAGG AAAAAAGGC
 451 TCCAAGGGAG ACACATGTGG GAATTGTACC AAAGGAGAAA AAGGAGACCA
 501 AGGGGCTATG GGCTCACCTG GCCTGCACGG AGGGCCTGGC GCCAAGGGAG
 551 AGAAGGGGGA GATGGGGGAG AAGGGGAGGA TGGGGGATAA GGGCTGCTGT
 601 GGAGATTCTG GGGAGAGGGG AGGAAAAGGA CAGAAAGGTG AGGGGGGTAT
 651 GAAAGGGGAA AAAGGTAGCA AAGGAGACAG TGAATGGAA GGCAAAGCG
 701 GCCGTAATGG TCTGCCTGGG GCCAAAGGTG ATCCAGGGAT TAAAGGAGAA
 751 AAAGGAGAGT TAGGTCCTCC TGGTCTCCTG GGACCTACTG GGCCGAAGGG
 801 TGACATTGGC AACAAAGGGG TCCGAGGCC CACTGGGAAG AAGGGCTCTC
 851 GGGGCTTTAA AGGCTCCAAG GGTGAGTTGG C

10

【 0 0 9 0 】

20

配列番号： 2 (INSP161 成熟ポリペプチド配列)

1 KTHPTKFTK KSEEREMPKG LKPSSGPPPE EEETLFTEMA EMAEPITKPS
 51 ALDSVFGTAT LSPFENFTLD PADFFLNCCD CCSPVPGQKG EPGETGQPGP
 101 KGEAGNLGIP GPPGVVGPQG PRGYKGEKGE PGPKGDKGNI GLGGVKGQKG
 151 SKGDTGCNCT KGEKGDQGM GSPGLHGGPG AKGEKGEKGE KGEMGDKGCC
 201 GDSGERGGKG QKGEKGMKGE KGSKGDSGME GKSGRNLPG AKGDPGKIGE
 251 KGELGPPGLL GPTGPKGDIG NKGVRGPTGK KGSRGFKGSK GELA

【 0 0 9 1 】

配列番号： 3 (INSP161-A ヌクレオチド配列)

1 TCCAGTGGCC CACCTCCAGA AGAAGAAGAA ACCCTCTTCA CAGAAATGGC
 51 TGAAATGGCA GAACCAATTA CCAAACCCTC GGCCTTGGAT TCTGTCTTTG
 101 GCACTGCCAC TCTCTCTCCC TTTGAAAAC TCACTCTTGA CCCAGCTGAT
 151 TTCTTTTTGA ATTGTTGTGA TTGTTGTTCA CCTGTACCCG GGCAGAAAGG
 201 AGAACCTGGA GAGACTGGAC AGCCAGGTCC TAAAGGAGAG GCTGGAAATT
 251 TGGGGATCCC AGGGCCACCA GGAGTTGTTG GGCCCAAGG CCCTAGAGGC
 301 TACAAAGGAG AGAAAGGTGA ACCTGGCCCT AAGGGAGATA AAGGAAACAT
 351 TGGTTTGGGA GGAGTGAAAG GACAAAAGG CTCCAAGGGA GACACATGTG
 401 GGAATTGTAC CAAAGGAGAA AAAGGAGACC AAGGGGCTAT GGGCTCACCT
 451 GGCCTGCACG GAGGGCCTGG CGCCAAGGGA GAGAAGGGGG AGATGGGGGA
 501 GAAGGGGGAG ATGGGGGATA AGGGCTGCTG TGGAGATTCT GGGGAGAGGG
 551 GAGGAAAAGG ACAGAAAGGT GAGGGGGGTA TGAAAGGGGA AAAAGGTAGC
 601 AAAGGAGACA GTGGAATGGA AGGCAAAAGC GGCCGTAATG GTCTGCCTGG
 651 GGCCAAAGGT GATCCAGGGA TTAAAGGAGA AAAAGGAGAG TTAGGTCCTC
 701 CTGGTCTCCT GGGACCTACT GGGCCGAAGG GTGACATTGG CAACAAAGGG
 751 GTCCGAGGCC CCACTGGGAA GAAGGGCTCT CGGGGCTTTA AAGGCTCCAA
 801 GGGTGAGTTG GCTAGAGTGC CCCGGTCGGC TTTCAGCGCT GGTGTTGCAA
 851 AGCCATTTCC TCCTCCTAAC ATCCCATCA AATTTGAAA GATTCTCTAT
 901 AATGACCAAG GGAATTACAG TCCTGTCACT GGGAAGTTTA ACTGCTCTAT
 951 TCCTGGGACA TATGTTTTTT CCTACCATAT TACGGTGAGG GGGCGACCTG
 1001 CTCGAATCAG TCTGGTGGCC CAGAATAAGA AGCAGTTCAA GTCCAGAGAA

30

40

50

1051 ACTCTCTATG GTCAGGAAAT AGACCAGGCC TCTCTCCTCG TCATCTTGAA
 1101 ATTAAGTGCA GGAGACCAAG TCTGGCTTGA GGTGTCAAAA GATTGGAATG
 1151 GGGTGTATGT CAGTGTCTGAG GATGACAGCA TTTTACTGG GTTCCTTTTG
 1201 TACCCAGAGG AACTTCTGG AATTCACCA

【 0 0 9 2 】

配列番号： 4 (INSP161-A ポリペプチド配列)

1 SSGPPPEEEE TLFTEMAEMA EPITKPSALD SVFGTATLSP FENFTLDPAD
 51 FFLNCCDCCS PVPGQKGEPE ETGQPGPKGE AGNLGIPGPP GVVGPQGPRG
 101 YKGEKGEPEP KGDKNIGLIG GVKGQKGSKG DTCGNCTKGE KGDQGAMGSP
 151 GLHGGPGAKG EKGEMGEKGE MGDKGCCGDS GERGGKGQKG EGGMKGEKGS
 201 KGDSGMEGKS GRNGLPGAAG DPGIKGEKGE LGPPGLLGPT GPKGDIGNKG
 251 VRGPTGKKGS RGFKGSKGEL ARVPRSAFSA GLSKPFPPN IPIKFEKILY
 301 NDQGNYSPTV GKFNCSIPGT YVFSYHITVR GRPARISLVA QNKKQFKSRE
 351 TLYGQEIDQA SLLVILKLSA GDQVWLEVSK DWNGVYVSAE DDSIFTGFL
 401 YPEETSGISP

10

【 0 0 9 3 】

配列番号： 5 (INSP161-B ヌクレオチド配列)

1 TCCAGTGGCC CACCTCCAGA AGAAGAAGAA ACCCTCTTCA CAGAAATGGC
 51 TGAAATGGCA GAACCAATTA CCAAACCTC GGCCTTGGAT TCTGTCTTTG
 101 GCACTGCCAC TCTCTCTCCC TTTGAAAAC TCACTCTTGA CCCAGCTGAT
 151 TTCTTTTTGA ATTGTTGTGA TTGTTGTTCA CCTGTACCCG GGCAGAAAGG
 201 AGAACCTGGA GAGACTGGAC AGCCAGGTCC TAAAGGAGAG GCTGGAAT
 251 TGGGGATCCC AGGGCCACCA GGAGTTGTTG GGCCCAAGG CCCTAGAGGC
 301 TACAAAAGGAG AGAAAGGTGA ACCTGGCCCT AAGGGAGATA AAGGAAACAT
 351 TGGTTTGGGA GGAGTAAAAG GACAAAAAGG CTCCAAGGGA GACACATGTG
 401 GGAATTGTAC CAAAGGAGAA AAAGGAGACC AAGGGGCTAT GGGCTCACCT
 451 GGCTGCACG GAGGGCCTGG CGCCAAGGGA GAGAAGGGGG AGATGGGGGA
 501 GAAGGGGGAG ATGGGGGATA AGGGCTGCTG TGGAGATTCT GGGGAGAGGG
 551 GAGGAAAAGG ACAGAAAGGT GAGGGGGGTA TGAAAGGGGA AAAAGGTAGC
 601 AAAGGAGACA GTGGAATGGA AGGCAAAAGC GGCCGTAATG GTCTGCCTGG
 651 GGCCAAAGGT GATCCAGGGA TTAAAGGAGA AAAAGGAGAG TTAGGTCCTC
 701 CTGGTCTCCT GGGACCTACT GGGCCGAAGG GTGACATTGG CAACAAAGGG
 751 GTCCGAGGCC CCACTGGGAA GAAGGGCTCT CGGGGCTTTA AAGGC

20

30

【 0 0 9 4 】

配列番号： 6 (INSP161-B ポリペプチド配列)

1 SSGPPPEEEE TLFTEMAEMA EPITKPSALD SVFGTATLSP FENFTLDPAD
 51 FFLNCCDCCS PVPGQKGEPE ETGQPGPKGE AGNLGIPGPP GVVGPQGPRG
 101 YKGEKGEPEP KGDKNIGLIG GVKGQKGSKG DTCGNCTKGE KGDQGAMGSP
 151 GLHGGPGAKG EKGEMGEKGE MGDKGCCGDS GERGGKGQKG EGGMKGEKGS
 201 KGDSGMEGKS GRNGLPGAAG DPGIKGEKGE LGPPGLLGPT GPKGDIGNKG
 251 VRGPTGKKGS RGFKG

40

【 0 0 9 5 】

配列番号： 7 (INSP161-C ヌクレオチド配列)

1 TCCAAGGGTG AGTTGGCTAG AGTGCCCCGG TCGGCTTTCA GCGCTGGTTT
 51 GTCAAAGCCA TTTCTCCTC CTAACATCCC CATCAAATTT GAAAAGATTC
 101 TCTATAATGA CCAAGGGAAT TACAGTCTG TCACTGGGAA GTTTAACTGC
 151 TCTATTCTG GGACATATGT TTTTCTAC CATATTACGG TGAGGGGGCG
 201 ACCTGCTCGA ATCAGTCTGG TGGCCAGAA TAAGAAGCAG TTCAAGTCCA
 251 GAGAACTCT CTATGGTCAG GAAATAGACC AGGCCTCTCT CCTCGTCATC
 301 TTGAAATTA GTGCAGGAGA CCAAGTCTGG CTTGAGGTGT CAAAAGATTG

50

351 GAATGGGGTG TATGTCAGTG CTGAGGATGA CAGCATT TTTT ACTGGGTTCC
 401 TTTTGTACCC AGAGGAAACT TCTGGAATTT CACCA

【 0 0 9 6 】

配列番号： 8 (INSP161-C ポリペプチド配列)

1 SKGELARVPR SAFSAGLSKP FPPNPIPIKF EKILYNDQGN YSPVTGKFNC
 51 SIPGTYVFSY HITVRGRPAR ISLVAQNKKQ FKSRETLYGQ EIDQASLLVI
 101 LKLSAGDQVW LEVSKDWNQV YVSAEDDSIF TGFLLYPEET SGISP

【 0 0 9 7 】

配列番号： 9 (C1q ヌクレオチド配列)

1 GCTTTCAGCG CTGGTTTGTG AAAGCCATTT CCTCCTCCTA ACATCCCCAT
 51 CAAATTTGAA AAGATTCTCT ATAATGACCA AGGGAATTAC AGTCCTGTCA
 101 CTGGGAAGTT TAACTGCTCT ATTCCTGGGA CATATGTTTT TTCCTACCAT
 151 ATTACGGTGA GGGGGCGACC TGCTCGAATC AGTCTGGTGG CCCAGAATAA
 201 GAAGCAGTTC AAGTCCAGAG AAACCTCTCTA TGGTCAGGAA ATAGACCAGG
 251 CCTCTCTCCT CGTCATCTTG AAATTAAGTG CAGGAGACCA AGTCTGGCTT
 301 GAGGTGTCAA AAGATTGGAA TGGGGTGTAT GTCAGTGCTG AGGATGACAG
 351 CATTTTTACT GGGTTCCTTT TG

10

【 0 0 9 8 】

配列番号： 10 (C1q ポリペプチド配列)

1 AFSAGLSKPF PPPNPIPIKFE KILYNDQGN SPVTGKFNC IPGTYVFSYH
 51 ITVRGRPAR I SLVAQNKKQF KSRETLYGQE IDQASLLVIL KLSAGDQVWL
 101 EVSKDWNQVY VSAEDDSIFT GFL

20

【 0 0 9 9 】

配列番号： 11 (ヒスチジンタグ INSP161 成熟ヌクレオチド配列)

1 AAGACCACAC CACATACCAA ATTTACGAAG AAATCTGAGG AAAGAGAGAT
 51 GCCAAAGGGT CTAAAGCCAT CCAGTGGCCC ACCTCCAGAA GAAGAAGAAA
 101 CCCTCTTAC AGAAATGGCT GAAATGGCAG AACCAATTAC CAAACCCTCG
 151 GCCTTGGATT CTGTCTTTGG CACTGCCACT CTCTCTCCCT TTGAAAACCT
 201 CACTCTTGAC CCAGCTGATT TCTTTTTGAA TTGTTGTGAT TGTTGTTTAC
 251 CTGTACCCGG GCAGAAAGGA GAACCTGGAG AGACTGGACA GCCAGGTCCT
 301 AAAGGAGAGG CTGAAAATTT GGGGATCCCA GGGCCACCAG GAGTTGTTGG
 351 GCCCAAGGC CCTAGAGGCT ACAAAGGAGA GAAAGGTGAA CCTGGCCCTA
 401 AGGGAGATAA AGGAAACATT GGTTTGGGAG GAGTGAAAGG AAAAAAGGC
 451 TCCAAGGGAG ACACATGTGG GAATTGTACC AAAGGAGAAA AAGGAGACCA
 501 AGGGGCTATG GGCTCACCTG GCCTGCACGG AGGGCCTGGC GCCAAGGGAG
 551 AGAAGGGGGA GATGGGGGAG AAGGGGGAGA TGGGGGATAA GGGCTGCTGT
 601 GGAGATTCTG GGGAGAGGGG AGGAAAAGGA CAGAAAGGTG AGGGGGGTAT
 651 GAAAGGGGAA AAAGGTAGCA AAGGAGACAG TGAATGGAA GGCAAAGCG
 701 GCCGTAATGG TCTGCCTGGG GCCAAAGGTG ATCCAGGGAT TAAAGGAGAA
 751 AAAGGAGAGT TAGGTCCTCC TGGTCTCCTG GGACCTACTG GGCCGAAGGG
 801 TGACATTGGC AACAAAGGGG TCCGAGGCC CACTGGGAAG AAGGGCTCTC
 851 GGGGCTTTAA AGGCTCCAAG GGTGAGTTGG CCACCATCAC CATCACCAT

30

40

【 0 1 0 0 】

配列番号： 12 (ヒスチジンタグ INSP161 成熟ポリペプチド配列)

1 KTHPHTKFTK KSEEREMPKG LKPSSGPPPE EEETLFTEMA EMAEPITKPS
 51 ALDSVFGTAT LSPFENFTLD PADFFLNCCD CCSPVPGQKG EPGETGQPGP
 101 KGEAGNLGIP GPPGVVGPQG PRGYKGEKGE PGPKGDKGNI GLGGVKGQKG
 151 SKGDTGCTG KGEKGDQAM GSPGLHGGPG AKGEKGEKGE KGEMGDKGCC
 201 GDSGERGGKG QKGEKGMKGE KSKGDSGME GKSGRNLPG AKGDPGKGE
 251 KGELGPPGLL GPTGPKGDIG NKGVRGPTGK KSGRFGKSK GELAHHHHHH

50

【 0 1 0 1 】

配列番号： 13 (ヒスチジンタグ INSP161-A ヌクレオチド配列)

1 TCCAGTGGCC CACCTCCAGA AGAAGAAGAA ACCCTCTTCA CAGAAATGGC
 51 TGAAATGGCA GAACCAATTA CCAAACCCTC GGCCTTGGAT TCTGTCTTTG
 101 GCACTGCCAC TCTCTCTCCC TTTGAAAAC TCACTCTTGA CCCAGCTGAT
 151 TTCTTTTTGA ATTGTTGTGA TTGTTGTTCA CCTGTACCCG GGCAGAAAGG
 201 AGAACCTGGA GAGACTGGAC AGCCAGGTCC TAAAGGAGAG GCTGGAAATT
 251 TGGGGATCCC AGGGCCACCA GGAGTTGTTG GGCCCAAGG CCCTAGAGGC
 301 TACAAAGGAG AGAAAGGTGA ACCTGGCCCT AAGGGAGATA AAGGAAACAT
 351 TGGTTTGGGA GGAGTGAAAG GACAAAAAGG CTCCAAGGGA GACACATGTG
 401 GGAATTGTAC CAAAGGAGAA AAAGGAGACC AAGGGGCTAT GGGCTCACCT
 451 GGCCTGCACG GAGGGCCTGG CGCCAAGGGA GAGAAGGGGG AGATGGGGGA
 501 GAAGGGGGGAG ATGGGGGATA AGGGCTGCTG TGGAGATTCT GGGGAGAGGG
 551 GAGGAAAAGG ACAGAAAGGT GAGGGGGGTA TGAAAGGGGA AAAAGGTAGC
 601 AAAGGAGACA GTGGAATGGA AGGCAAAAGC GGCCGTAATG GTCTGCCTGG
 651 GGCCAAAGGT GATCCAGGGA TTAAAGGAGA AAAAGGAGAG TTAGTCTCTC
 701 CTGGTCTCCT GGGACCTACT GGGCCGAAGG GTGACATTGG CAACAAAGGG
 751 GTCCGAGGCC CCACTGGGAA GAAGGGCTCT CGGGGCTTTA AAGGCTCCAA
 801 GGGTGAGTTG GCTAGAGTGC CCCGGTCGGC TTTGAGCGCT GGTGTGTCAA
 851 AGCCATTTCC TCCTCCTAAC ATCCCATCA AATTTGAAAA GATTCTCTAT
 901 AATGACCAAG GGAATTACAG TCCTGTCACT GGAAGTTTA ACTGCTCTAT
 951 TCCTGGGACA TATGTTTTTT CCTACCATAT TACGGTGAGG GGGCGACCTG
 1001 CTCGAATCAG TCTGGTGGCC CAGAATAAGA AGCAGTTCAA GTCCAGAGAA
 1051 ACTCTCTATG GTCAGGAAAT AGACCAGGCC TCTCTCTCG TCATCTTGAA
 1101 ATTAAGTGCA GGAGACCAAG TCTGGCTTGA GGTGTCAAAA GATTGGAATG
 1151 GGGTGTATGT CAGTGCTGAG GATGACAGCA TTTTACTGG GTTCCTTTTG
 1201 TACCCAGAGG AACTTCTGG AATTTACCA CACCATCACC ATCACCAT

10

20

【 0 1 0 2 】

配列番号： 14 (ヒスチジンタグ INSP161-A ポリペプチド配列)

1 SSGPPPEEEE TLFTEMAEMA EPITKPSALD SVFGTATLSP FENFTLDPAD
 51 FFLNCCDCCS PVPGQKGEPE ETGQPQPKGE AGNLGIPGP GVVGPPQGPRG
 101 YKGEKGEPEP KGDKNIGLG GVKGQKGSKG DTCGNCTKGE KGDQGAMGSP
 151 GLHGGPGAKG EKGEMGEKGE MGDKGCCGDS GERGGKQKGE EGGMKGEKGS
 201 KGDSGMEGKS GRNGLPGAKG DPGIKGEKGE LGPPGLLPT GPKGDIGNKG
 251 VRGPTGKKGS RGFKGSKGEL ARVPRSAFSA GLSKPFPPN IPIKFEKILY
 301 NDQGNYSPTV GKFNCVIPGT YVFSYHITVR GRPARISLVA QNKKQFKSRE
 351 TLYGQEIDQA SLLVILKLSA GDQVWLEVSK DWNGVYVSAE DDSIFTGFLF
 401 YPEETSGISP HHHHHH

30

【 0 1 0 3 】

配列番号： 15 (ヒスチジンタグ INSP161-B ヌクレオチド配列)

1 TCCAGTGGCC CACCTCCAGA AGAAGAAGAA ACCCTCTTCA CAGAAATGGC
 51 TGAAATGGCA GAACCAATTA CCAAACCCTC GGCCTTGGAT TCTGTCTTTG
 101 GCACTGCCAC TCTCTCTCCC TTTGAAAAC TCACTCTTGA CCCAGCTGAT
 151 TTCTTTTTGA ATTGTTGTGA TTGTTGTTCA CCTGTACCCG GGCAGAAAGG
 201 AGAACCTGGA GAGACTGGAC AGCCAGGTCC TAAAGGAGAG GCTGGAAATT
 251 TGGGGATCCC AGGGCCACCA GGAGTTGTTG GGCCCAAGG CCCTAGAGGC
 301 TACAAAGGAG AGAAAGGTGA ACCTGGCCCT AAGGGAGATA AAGGAAACAT
 351 TGGTTTGGGA GGAGTGAAAG GACAAAAAGG CTCCAAGGGA GACACATGTG
 401 GGAATTGTAC CAAAGGAGAA AAAGGAGACC AAGGGGCTAT GGGCTCACCT
 451 GGCCTGCACG GAGGGCCTGG CGCCAAGGGA GAGAAGGGGG AGATGGGGGA

40

50

501 GAAGGGGGAG ATGGGGGATA AGGGCTGCTG TGGAGATTCT GGGGAGAGGG
 551 GAGGAAAAGG ACAGAAAAGGT GAGGGGGGTA TGAAAGGGGA AAAAGGTAGC
 601 AAAGGAGACA GTGGAATGGA AGGCAAAAGC GGCCGTAATG GTCTGCCTGG
 651 GGCCAAAGGT GATCCAGGGA TTAAAGGAGA AAAAGGAGAG TTAGGTCCTC
 701 CTGGTCTCCT GGGACCTACT GGGCCGAAGG GTGACATTGG CAACAAAGGG
 751 GTCCGAGGCC CCACTGGGAA GAAGGGCTCT CGGGGCTTTA AAGGCCACCA
 801 TCACCATCAC CAT

【 0 1 0 4 】

配列番号: 16 (ヒスチジンタグ INSP161-B ポリペプチド配列)

1 SSGPPPEEEE TLFTEMAEMA EPITKPSALD SVFGTATLSP FENFTLDPAD
 51 FFLNCCDCCS PVPGQKGEPE ETGQPGPKGE AGNLGIPGPP GVVGPPQGPRG
 101 YKGEKGEPPG KGDKNIGLG GVKGQKGSKG DTCGNCTKGE KGDQGMGSP
 151 GLHGGPGAKG EKGEMGEKGE MGDKGCCGDS GERGGKQKQK EGGMKGEKGS
 201 KGDSGMEGKS GRNGLPGAKG DPGIKGEKGE LGPPGLLGPT GPKGDIGNKG
 251 VRGPTGKKGS RGFKGHHHHH H

10

【 0 1 0 5 】

配列番号: 17 (ヒスチジンタグ INSP161-C ヌクレオチド配列)

1 TCCAAGGGTG AGTTGGCTAG AGTGCCCCGG TCGGCTTTCA GCGCTGGTTT
 51 GTCAAAGCCA TTTCTCCTC CTAACATCCC CATCAAATTT GAAAAGATTC
 101 TCTATAATGA CCAAGGGAAT TACAGTCCTG TCACTGGGAA GTTTAACTGC
 151 TCTATTCCTG GGACATATGT TTTTCTCTAC CATATTACGG TGAGGGGGCG
 201 ACCTGCTCGA ATCAGTCTGG TGGCCCAGAA TAAGAAGCAG TTCAAGTCCA
 251 GAGAAACTCT CTATGGTCAG GAAATAGACC AGGCCTCTCT CCTCGTCATC
 301 TTGAAATTA GTGCAGGAGA CCAAGTCTGG CTTGAGGTGT CAAAAGATTG
 351 GAATGGGGTG TATGTCAGTG CTGAGGATGA CAGCATTTTT ACTGGGTTCC
 401 TTTTGTACCC AGAGGAAACT TCTGGAATTT CACCACACCA TCACCATCAC
 451 CAT

20

【 0 1 0 6 】

配列番号: 18 (ヒスチジンタグ INSP161-C ポリペプチド配列)

1 SKGELARVPR SAFSAGLSKP FPPNPIKIF EKILYNDQGN YSPVTGKFNC
 51 SIPGTYVFSY HITVRGRPAR ISLVAQNKKQ FKSRETYLQ EIDQASLLVI
 101 LKLSAGDQVW LEVSKDWNQV YVSAEDDSIF TGFLLYPEET SGISPHHHHH
 151 H

30

【 0 1 0 7 】

配列番号: 19 (ヒスチジンタグ C1q ヌクレオチド配列)

1 GCTTTCAGCG CTGGTTTGTG AAAGCCATTT CCTCCTCCTA ACATCCCCAT
 51 CAAATTTGAA AAGATTCTCT ATAATGACCA AGGGAATTAC AGTCCTGTCA
 101 CTGGGAAGTT TAACTGCTCT ATTCCTGGGA CATATGTTTT TTCCTACCAT
 151 ATTACGGTGA GGGGGCGACC TGCTCGAATC AGTCTGGTGG CCCAGAATAA
 201 GAAGCAGTTC AAGTCCAGAG AAACCTCTCTA TGGTCAGGAA ATAGACCAGG
 251 CCTCTCTCCT CGTCATCTTG AAATTAAGTG CAGGAGACCA AGTCTGGCTT
 301 GAGGTGTCAA AAGATTGGAA TGGGGTGTAT GTCAGTGCTG AGGATGACAG
 351 CATTTTTACT GGGTTCCTTT TGCACCATCA CCATCACCAT

40

【 0 1 0 8 】

配列番号: 20 (ヒスチジンタグ C1q ポリペプチド配列)

1 AFSAGLSKPF PPPNPIKFE KILYNDQGN YSPVTGKFNC IPGTYVFSYH
 51 ITVRGRPARI SLVAQNKKQF KSRETYLQ EIDQASLLVIL KLSAGDQVWL
 101 EVSKDWNQVY VSAEDDSIFT GFLHHHHHHH

【 0 1 0 9 】

配列番号: 21 (INSP161 ヌクレオチド配列)

50

1 ATGTATATAT TTTCTATTA TATCTTTCTT CCAGCTTCAA ATATGTGGAT
 51 GTTTTCTTGG CTTTGTGCTA TTTTAATTAT TTTGGCTATT GCTGGTATGA
 101 ACACAATAGC AAAGACCACA CCACATACCA AATTTACGAA GAAATCTGAG
 151 GAAAGAGAGA TGCCAAAGGG TCTAAAGCCA TCCAGTGGCC CACCTCCAGA
 201 AGAAGAAGAA ACCCTCTTCA CAGAAATGGC TGAAATGGCA GAACCAATTA
 251 CCAAACCCTC GGCCTTGAT TCTGTCTTTG GCACTGCCAC TCTCTCTCCC
 301 TTTGAAAAC TCACTCTTGA CCCAGCTGAT TTCTTTTTGA ATTGTTGTGA
 351 TTGTTGTTCA CCTGTACCCG GGCAGAAAGG AGAACCTGGA GAGACTGGAC
 401 AGCCAGGTCC TAAAGGAGAG GCTGGAAATT TGGGGATCCC AGGGCCACCA
 451 GGAGTTGTTG GGCCCAAGG CCCTAGAGGC TACAAAGGAG AGAAAGGTGA
 501 ACCTGGCCCT AAGGGAGATA AAGGAAACAT TGGTTTGGGA GGAGTGAAAG
 551 GACAAAAAGG CTCCAAGGGA GACACATGTG GGAATTGTAC CAAAGGAGAA
 601 AAAGGAGACC AAGGGGCTAT GGGCTCACCT GGCCTGCACG GAGGGCCTGG
 651 CGCCAAGGGA GAGAAGGGGG AGATGGGGGA GAAGGGGGAG ATGGGGGATA
 701 AGGGCTGCTG TGGAGATTCT GGGGAGAGGG GAGGAAAAGG ACAGAAAGGT
 751 GAGGGGGGTA TGAAAGGGGA AAAAGGTAGC AAAGGAGACA GTGGAATGGA
 801 AGGCAAAAGC GGCCGTAATG GTCTGCCTGG GGCCAAAGGT GATCCAGGGA
 851 TAAAGGAGA AAAAGGAGAG TTAGGTCCTC CTGGTCTCCT GGGACCTACT
 901 GGGCCGAAGG GTGACATTGG CAACAAAGGG GTCCGAGGCC CCACTGGGAA
 951 GAAGGGCTCT CGGGGCTTTA AAGGCTCCAA GGGTGAGTTG GCTAGAGTGC
 1001 CCCGGTCGGC TTTCAGCGCT GGTGTTGCAA AGCCATTTCC TCCTCCTAAC
 1051 ATCCCCATCA AATTTGAAAA GATTCTCTAT AATGACCAAG GGAATTACAG
 1101 TCCTGTCACT GGGAAGTTTA ACTGCTCTAT TCCTGGGACA TATGTTTTTT
 1151 CCTACCATAT TACGGTGAGG GGGCGACCTG CTCGAATCAG TCTGGTGGCC
 1201 CAGAATAAGA AGCAGTTCAA GTCCAGAGAA ACTCTCTATG GTCAGGAAAT
 1251 AGACCAGGCC TCTCTCCTCG TCATCTTGAA ATTAAGTGCA GGAGACCAAG
 1301 TCTGGCTTGA GGTGTCAAAA GATTGGAATG GGGTGTATGT CAGTGCTGAG
 1351 GATGACAGCA TTTTACTGG GTTCCTTTTG TACCCAGAGG AAACCTCTGG
 1401 AATTTACCA

10

20

30

【 0 1 1 0 】

配列番号： 22 (INSP161 ポリペプチド配列)

1 MYIFSYYIFL PASNMWMSW LCAILILAI AGMNTIAKTT PHTKFTKKSE
 51 EREMPKGLKP SSGPPPEEEE TLFTEMAEMA EPITKPSALD SVFGTATLSP
 101 FENFTLDPAD FFLNCCDCCS PVPGQKGEPE ETGQPGPKGE AGNLGIPGPP
 151 GVVGPQGPRG YKGEKGEPPG KGDKGNIGLG GVKGQKGSKG DTCGNCTKGE
 201 KGDQGMGSP GLHGGPGAKG EKGEMGEKGE MGDKGCCGDS GERGGKGQKG
 251 EGGMKGEKGS KGDSGMEGKS GRNGLPGAKG DPGIKGEKGE LGPPGLLGPT
 301 GPKGDIGNKG VRGPTGKKGS RGFKGSKGEL ARVPRSAFSA GLSKPFPPPN
 351 IPIKFEKILY NDQGNYSPT GKFNC SIPGT YVFSYHITVR GRPARISLVA
 401 QNKKQFKSRE TLYGQEIDQA SLLVILKLSA GDQVWLEVSK DWNGVYVSAE
 451 DDSIFTGFLL YPEETSGISP

40

【 0 1 1 1 】

配列番号： 23 (ヒスチジンタグ INSP161 ヌクレオチド配列)

1 ATGTATATAT TTTCTATTA TATCTTTCTT CCAGCTTCAA ATATGTGGAT
 51 GTTTTCTTGG CTTTGTGCTA TTTTAATTAT TTTGGCTATT GCTGGTATGA
 101 ACACAATAGC AAAGACCACA CCACATACCA AATTTACGAA GAAATCTGAG
 151 GAAAGAGAGA TGCCAAAGGG TCTAAAGCCA TCCAGTGGCC CACCTCCAGA
 201 AGAAGAAGAA ACCCTCTTCA CAGAAATGGC TGAAATGGCA GAACCAATTA
 251 CCAAACCCTC GGCCTTGAT TCTGTCTTTG GCACTGCCAC TCTCTCTCCC
 301 TTTGAAAAC TCACTCTTGA CCCAGCTGAT TTCTTTTTGA ATTGTTGTGA

50

351 TTGTTGTTCA CCTGTACCCG GGCAGAAAGG AGAACCTGGA GAGACTGGAC
 401 AGCCAGGTCC TAAAGGAGAG GCTGGAAATT TGGGGATCCC AGGGCCACCA
 451 GGAGTTGTTG GGCCCCAAGG CCCTAGAGGC TACAAAGGAG AGAAAGGTGA
 501 ACCTGGCCCT AAGGGAGATA AAGGAAACAT TGGTTTGGGA GGAGTAAAAG
 551 GACAAAAAGG CTCCAAGGGA GACACATGTG GGAATTGTAC CAAAGGAGAA
 601 AAAGGAGACC AAGGGGCTAT GGGCTCACCT GGCCTGCACG GAGGGCCTGG
 651 CGCCAAGGGA GAGAAGGGGG AGATGGGGGA GAAGGGGGAG ATGGGGGATA
 701 AGGGCTGCTG TGGAGATTCT GGGGAGAGGG GAGGAAAAGG ACAGAAAAGGT
 751 GAGGGGGGTA TGAAAGGGGA AAAAGGTAGC AAAGGAGACA GTGGAATGGA
 801 AGGCAAAAAGC GGCCGTAATG GTCTGCCTGG GGCCAAAGGT GATCCAGGGA
 851 TTAAAGGAGA AAAAGGAGAG TTAGGTCCTC CTGGTCTCCT GGGACCTACT
 901 GGGCCGAAGG GTGACATTGG CAACAAAGGG GTCCGAGGCC CCACTGGGAA
 951 GAAGGGCTCT CGGGGCTTTA AAGGCTCCAA GGGTGAGTTG GCTAGAGTGC
 1001 CCCGGTCGGC TTTCAGCGCT GGTTCGTCAG AGCCATTTCC TCCTCCTAAC
 1051 ATCCCCATCA AATTTGAAAA GATTCTCTAT AATGACCAAG GGAATTACAG
 1101 TCCTGTCACT GGGAAGTTTA ACTGCTCTAT TCCTGGGACA TATGTTTTTT
 1151 CCTACCATAT TACGGTGAGG GGGCGACCTG CTCGAATCAG TCTGGTGGCC
 1201 CAGAATAAGA AGCAGTTCAA GTCCAGAGAA ACTCTCTATG GTCAGGAAAT
 1251 AGACCAGGCC TCTCTCCTCG TCATCTTGAA ATTAAGTGCA GGAGACCAAG
 1301 TCTGGCTTGA GGTGTCAAAA GATTGGAATG GGGTGTATGT CAGTGCTGAG
 1351 GATGACAGCA TTTTACTGG GTTCCTTTTG TACCCAGAGG AACTTCTGG
 1401 AATTTACCA CACCATCACC ATCACCAT

10

20

【 0 1 1 2 】

配列番号：24 (ヒスチジンタグ INSP161 ポリペプチド配列)

1 MYIFSYYIFL PASNMWMSW LCAILILAI AGMNTIAKTT PHTKFTKKSE
 51 EREMPKGLKP SSGPPPEEEE TLFTEMAEMA EPITKPSALD SVFGTATLSP
 101 FENFTLDPAD FFLNCCDCCS PVPGQKGEPE ETGQPGPKGE AGNLGIPGPP
 151 GVVGPQGRG YKGEKGEPEP KGDKGNIGLG GVKGQKGSKG DTCGNCTKGE
 201 KGDQGAMGSP GLHGGPGAKG EKGEMGEKGE MGDKGCCGDS GERGGKQKQK
 251 EGGMKGEKGS KGDSGMEGKS GRNGLPGAKG DPGIKGEKGE LGPPGLLGPT
 301 GPKGDIGNKG VRGPTGKKGS RGFKGSKGEL ARVPRSAFSA GLSKPFPPPN
 351 IPIKFEKILY NDQGNYSPTV GKFNCISIPGT YVFSYHITVR GRPARISLVA
 401 QNKKQFKSRE TLYGQEIDQA SLLVILKLSA GDQVWLEVSK DWNGVYVSAE
 451 DDSIFTGFLL YPEETSGISP HHHHHH

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 3 】

【 図 1 】 NCBI-nrデータベースにおける INSP161ポリペプチド配列(配列番号22)に対する上位10のBLASTpヒットを示す。

【 図 2 】 INSP161ポリペプチド配列(配列番号22)のためのシグナルペプチドの予想(シグナルP V2.0)を示す。

40

【 図 3 】 INSP161ポリペプチド配列(配列番号22)に関するNCBI CDD出力を示す。

【 図 4 】 クロニングした INSP161PCR生成物のヌクレオチド配列及び翻訳を示す。c1qドメイン及びコラーゲン領域(コラーゲンドメインを含む)は枠で囲まれている。コラーゲン領域は残基124から330に、c1qドメインは残基337から460に及ぶ。

【 図 5 】 SKI1切断(2つの切断部位が予想される)後の生物学的に活性化予想される生成物のポリペプチド配列を示す。A) INSP161の残基60と61の間でのSKI1の切断により生じる INSP161-Aポリペプチド配列。コラーゲン領域は残基64から270に及ぶ。B) INSP161の残基60と61の間及び残基325と326との間でのSKI1の切断により生じる INSP161-Bポリペプチド配列。コラーゲン領域は残基64から265に及ぶ。C) INSP161の残基325と326の間でのSKI1の切断により生じる INSP161-Cポリペプチド配列。c1qドメインは残基12から135に及ぶ。

50

【図6】ゲノムDNAにおけるINSP161をコードするエクソンの編成およびPCRプライマーの位置を示す。PCRプライマーの位置とセンスは矢印で表示されている。

【図7】INSP161、内耳特異的構造タンパク質 (SwissProt Acc. Code:COLE_LEPMA)、魚類の平衡砂のオトリン-1 (SwissProt Acc. Code:OT01_ONCKE)、ヒトアルファ1及びアルファ2 (VIII) 鎖 (SwissProt Acc. Code:CA18_HUMAN及びCOL8A2、SwissProt Acc. Code:CA28_HUMAN)、コラーゲンアルファ (X) 鎖前駆体 (COL10A1、SwissProt Acc. Code:CA1A_HUMAN) 及びアジポネクチン (SwissProt Acc. Code:APM1_HUMAN) の模式的ドメイン図を示す。

【図1】

Figure 1: NCBI-nrデータベースに対して得られたINSP161ポリペプチド配列 (配列番号18) についての最上位のblastpの結果

BLASTP 2.2.2 [Jan-08-2002]

参考文献: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

クエアリー = insp161.pep (470文字)

データベース: 全ての非反復 GenBank CDS

翻訳配列+PDB+SwissProt+PIR+PRF

1,523,012に配列; 総文字数 490,363,361

検索 終了

スコア E

有意なアラインメントも示した配列: 数値(ビット)

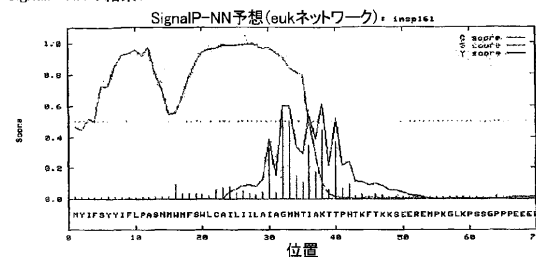
ref XP_067228.5	otolin-1[ホモサピエンス]と類似	...	907	0.0
ref XP_143327.1	内耳特異的コラーゲン前駆体に類似	...	622	e-177
ref XP_227256.1	内耳特異的コラーゲン前駆体に類似	...	530	e-149
sp P83371 OT01_ONCKE	Otolin-1 前駆体 >gi 18496364 dbj BAB8456...	...	365	e-100
sp P98085 COLE_LEPMA	内耳特異的コラーゲン前駆体 (SACC...	...	351	2e-95
pir A55797	コラーゲン前駆体、球形の特異的 ~ bluegill >gi	325	1e-87
ref XP_224253.1	仮説的蛋白質FLJ31208[ホモサピエンス]	...	257	4e-67
ref NP_648635.1	仮説的蛋白質MGC48915[ホモサピエンス]	...	249	6e-65
ref XP_290602.1	アジポネクチン前駆体と類似(30kDa脂肪細胞	...	249	1e-64
ref NP_777059.1	コラーゲン, X型, アルファ1(シュミット骨端線軟骨	...	246	6e-64

【図2】

Figure 2: INSP161ポリペプチド配列 (配列番号18) についてのシグナルペプチド予想 (SignalP V2.0) の出力結果

>insp161

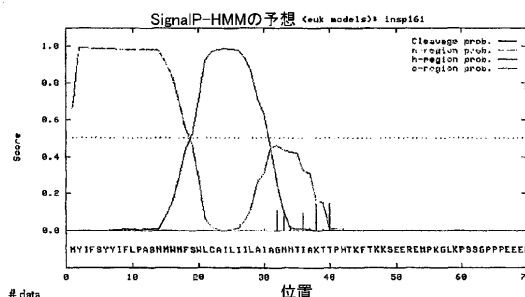
SignalP-NNの結果:



data

長さ = 70 シグナルペプチド
 # Measure Position Value Cutoff あるか否か?
 max. C 32 0.554 0.33 YES
 max. Y 38 0.513 0.32 YES
 max. S 28 0.592 0.32 YES
 max. S 4-37 0.502 0.47 YES
 * 最も可能性の高い切断部位, 37位と38位の間: TIA-KT

SignalP-HMMの結果:

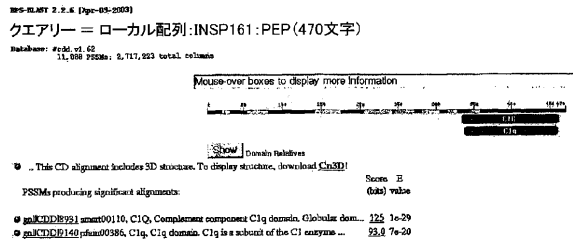


data

>insp161
 予想: シグナルペプチド
 シグナルペプチドの確立: 0.687
 シグナルアンカーの確立: 0.326
 最大切断部位の確立: 37位と38位の間で0.146

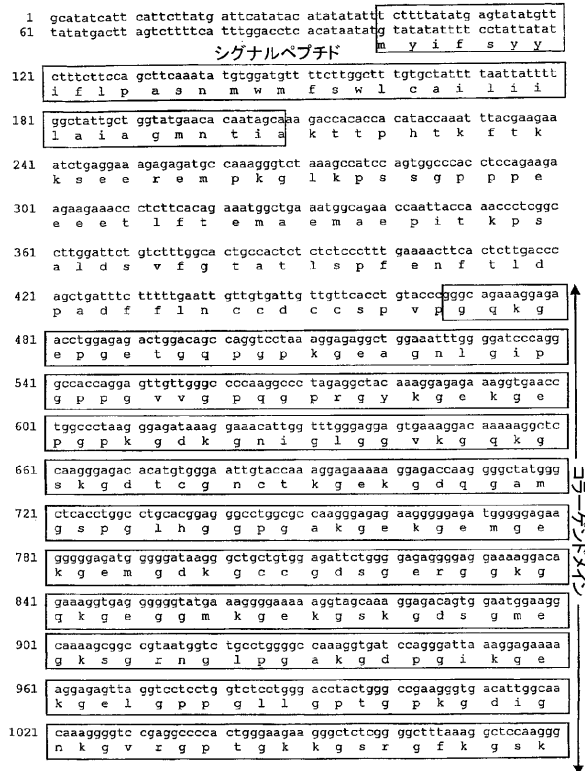
【 図 3 】

Figure 3: INSP161についてのNCBI CCDの出力結果

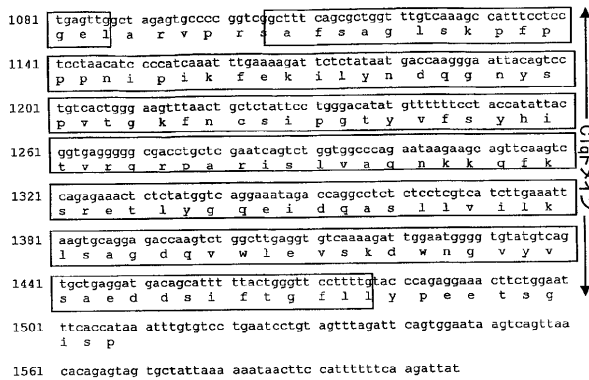


【 図 4 - 1 】

Figure 4: INSP161ヌクレオチド及びアミノ酸配列

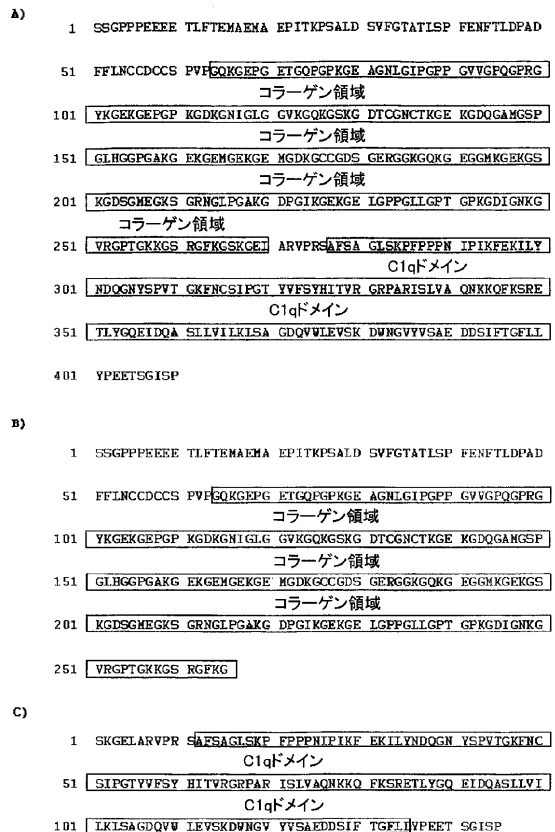


【 図 4 - 2 】

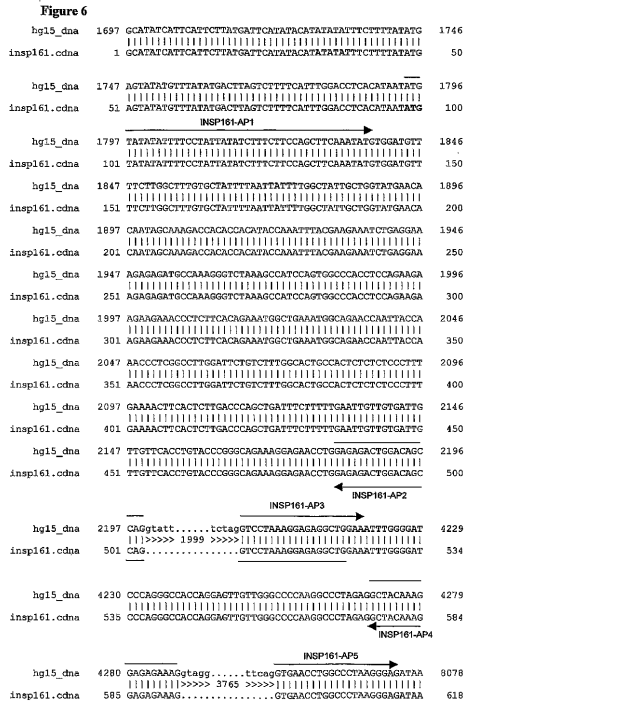


【 図 5 】

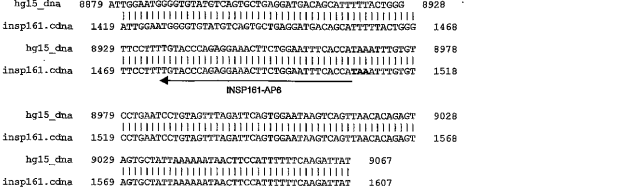
Figure 5



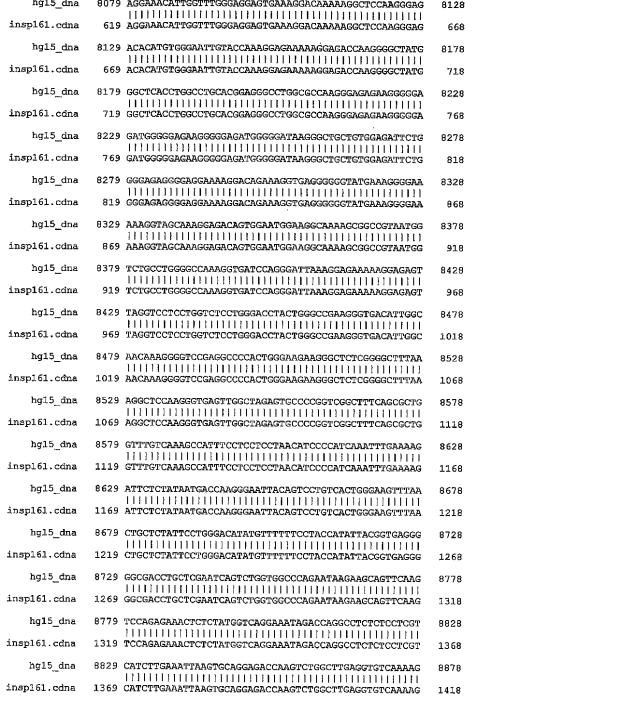
【 図 6 - 1 】



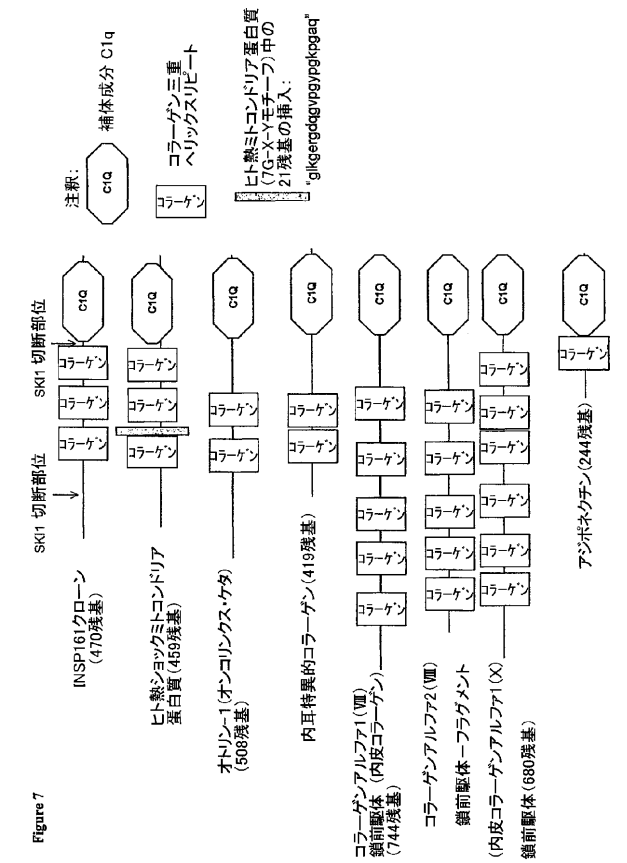
【 図 6 - 3 】



【 図 6 - 2 】



【 図 7 】



【配列表】

2007509606000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No /GB2004/004197
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 A61K38/00	C12N15/62 A61K39/00
	C12Q1/68 A61K31/7088	C07K16/18 G01N33/50
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N C12Q G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	<p>DATABASE Geneseq 'Online! 4 September 2003 (2003-09-04), "Human alpha 1 type XI collagen, isoform A preproprotein." XP002316776 retrieved from EBI accession no. GSN:ADP65251 Database accession no. ADP65251 abstract</p>	1-5
X	<p>-& DATABASE Geneseq 'Online! 4 September 2003 (2003-09-04), "Human alpha 1 type I collagen preproprotein, Collagen I, alpha-1." XP002316805 retrieved from EBI accession no. GSN:ADP65246 Database accession no. ADP65246 abstract</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-5
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex
* Special categories of cited documents.		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>*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</p> <p>*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</p> <p>*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</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 18 March 2005		Date of making of the international search report 31/03/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Oderwald, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/GB2004/004197

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	-& WO 03/072827 A (CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER) 4 September 2003 (2003-09-04) page 1 - page 12	6, 11, 13-19, 22-38, 40-46
X	WO 96/23866 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 8 August 1996 (1996-08-08) the whole document	1-7, 9, 13-19, 22-38, 40-48
X	DATABASE EMBL 'Online! 6 September 2002 (2002-09-06), "Sequence 22989 from Patent WO02068579." XP002316777 retrieved from EBI accession no. EM_PRO:CQ737055 Database accession no. CQ737055 abstract	11-14
X	-& WO 02/068579 A (PE CORPORATION) 6 September 2002 (2002-09-06) the whole document	15, 16, 22-24, 26-32, 34-38, 41-45
X	DATABASE EMBL 'Online! 14 December 2001 (2001-12-14), "Homo sapiens 3 BAC RP11-80B17 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence." XP002316778 retrieved from EBI accession no. EM_PRO:AC104471 Database accession no. AC104471 see nucleotides 112570-113500 abstract	11-14
P, X	DATABASE Geneseq 'Online! 23 October 2003 (2003-10-23), "Human heat mitochondrial protein as a therapeutic target SeqID2554." XP002316779 retrieved from EBI accession no. GSN:ADJ70748 Database accession no. ADJ70748 abstract	1-5
P, X	-& WO 03/087768 A (MITOKOR; THE BUCK INSTITUTE FOR AGE RESEARCH; GHOSH, SOUMITRA, S; FAHY) 23 October 2003 (2003-10-23) cited in the application page 1 - page 64; claims 7-19	6-10, 17, 18, 22-25, 31-38, 40-42, 46
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
.../GB2004/004197

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KISHORE U ET AL: "C1Q: STRUCTURE, FUNCTION, AND RECEPTORS" IMMUNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, vol. 49, no. 1/2, August 2000 (2000-08), pages 159-170, XP001078864 ISSN: 0162-3109 cited in the application the whole document -----	1-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2004/004197

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: 23, 25-32 (in part), 38, 40
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: 20, 21, 39
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/GB2004 /004197

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 23 and 25-32 (relating to vivo methods) are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 38 and 40 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/ composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 20,21,39

Claims 20, 21 and 39 relate to a product/compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely 'a compound that binds to a polypeptide without inducing any of the biological effects of the polypeptide' and 'an agonist' without giving a true technical characterisation. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Arts. 5 and 6 PCT). Consequently, no search has been carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

.../GB2004/004197

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 03072827	A	04-09-2003	AU	2002367732 A1	09-09-2003
			WO	03072827 A1	04-09-2003
WO 9623866	A	08-08-1996	US	5702948 A	30-12-1997
			WO	9623866 A1	08-08-1996
			US	5891850 A	06-04-1999
WO 02068579	A	06-09-2002	WO	02068579 A2	06-09-2002
WO 03087768	A	23-10-2003	AU	2003223520 A1	27-10-2003
			WO	03087768 A2	23-10-2003
			US	2004101874 A1	27-05-2004

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	4 C 0 8 6
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/15	Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72) 発明者 フィッツジェラルド スティーヴン ノエル

イギリス ダブリュー1ティー 2エヌユー ロンドン シャーロット ストリート 60 イン
ファーマティカ リミテッド内

(72) 発明者 フェイガン リチャード ジョセフ

イギリス ダブリュー1ティー 2エヌユー ロンドン シャーロット ストリート 60 イン
ファーマティカ リミテッド内

(72) 発明者 パワー クリスティン

フランス エフ-01710 トワリー リュー ド ジョンクイエ 10

(72)発明者 ヨーク メラニー

スイス ツェーハー 1 2 3 2 コンフィニヨン シュマン ド ヴィヨネックス 2 0 ア

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
HA08 HA12
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ12 QQ42 QQ53 QR08 QR32
QR36 QR42 QR50 QR55 QR62 QR72 QR77 QS03 QS25 QS28
QS34 QS36 QS39 QX01
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 DC50 NA14
ZA031 ZA151 ZA161 ZA331 ZA341 ZA361 ZA451 ZA671 ZA701 ZA811
ZA961 ZB071 ZB111 ZB261 ZB331 ZB351 ZB371 ZC022
4C085 AA03 BB11 BB23
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA03 ZA15 ZA16
ZA33 ZA34 ZA36 ZA45 ZA67 ZA70 ZA81 ZA96 ZB07 ZB11
ZB26 ZB33 ZB35 ZB37 ZC02 ZC35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2007509606A5	公开(公告)日	2007-11-22
申请号	JP2006530584	申请日	2004-10-01
[标]申请(专利权)人(译)	阿雷斯贸易股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	战神托盘资金兴业ANONYME		
[标]发明人	フィッツジェラルド スティーヴン ノエル フェイスガン リチャード ジョセフ パワー クリステン ヨーク メラニー		
发明人	フィッツジェラルド スティーヴン ノエル フェイスガン リチャード ジョセフ パワー クリステン ヨーク メラニー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K19/00 C07K16/18 C12Q1/68 A01K67/027 A61K38/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61K39/00 A61P37/02 A61P27/16 A61P25/28 A61P25/16 A61P29/00 A61P31/04 A61P31 /12 A61P33/00 A61P13/12 A61P3/04 A61P3/10 A61P19/08 A61P9/10 A61P1/02 A61P35/00 A61P9/00 A61P19/02 A61P27/02 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61P1/02 A61P13/12 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/16 A61P29 /00 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K19/00 C07K16/18 C12Q1/68.A A01K67/027 A61K37/02 A61K31 /7088 A61K48/00 A61K39/00.H A61P37/02 A61P27/16 A61P25/28 A61P25/16 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P13/12 A61P3/04 A61P3/10 A61P19/08 A61P9/10.101 A61P1/02 A61P35 /00 A61P9/00 A61P19/02 A61P27/02 A61P9/10 A61P43/00.111 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33 /50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063 /QQ08 4B063/QQ12 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063 /QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084 /ZA031 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZA361 4C084/ZA451 4C084 /ZA671 4C084/ZA701 4C084/ZA811 4C084/ZA961 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084 /ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZB371 4C084/ZC022 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/BB23 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA03 4C086/ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA33 4C086/ZA34 4C086/ZA36 4C086/ZA45 4C086/ZA67 4C086 /ZA70 4C086/ZA81 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZB37 4C086/ZC02 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	2003022998 2003-10-01 GB		
其他公开文献	JP2007509606A		
摘要(译)			

本发明在此涉及一种称为INSP161的新型蛋白质，其被鉴定为分泌的蛋白质，特别是含c1q结构域的蛋白质，以及来自该蛋白质的核酸序列和编码基因在疾病的诊断，预防和治疗中的用途。 要做。 [选择图]图7