

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-528336

(P2005-528336A)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-556441 (P2003-556441)	(71) 出願人	504238862
(86) (22) 出願日	平成14年12月20日 (2002.12.20)		アレス トレイディング ソシエテ アノ ニム
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月23日 (2004.8.23)		スイス ツェーハー 1 1 7 0 オーボンヌ ゾーヌ アンデュストリエル ド ルー リエッタ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/005865	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開番号	W02003/055911		弁理士 熊倉 禎男
(87) 国際公開日	平成15年7月10日 (2003.7.10)	(74) 代理人	100084009
(31) 優先権主張番号	0130738.8		弁理士 小川 信夫
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 稲田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シスチン-ノットフォールドタンパク質

(57) 【要約】

本発明は、本明細書でシスチン-ノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのDanファミリーのメンバーである分泌タンパク質と同定された新規なタンパク質 (INSP002)、並びに疾患の診断、予防および治療における前記タンパク質およびそのコード遺伝子に由来する核酸配列の使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の (i) から (iii) のいずれかのポリペプチド：

(i) 配列番号：6または配列番号：8に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) 分泌タンパク質の機能、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのメンバーの機能、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの機能を有する(i)のポリペプチドのフラグメント、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する(i)のポリペプチドのフラグメント；または

(iii) (i) もしくは (ii) の機能的等価物。

【請求項 2】

以下の (i) から (iii) のいずれかである、請求項 1 記載のポリペプチド：

(i) 配列番号：6または配列番号：8に記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド；

(ii) 分泌タンパク質の機能、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのメンバーの機能、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの機能を有する(i)のポリペプチドのフラグメント、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する(i)のポリペプチドのフラグメント；または

(iii) (i) もしくは (ii) の機能的等価物。

【請求項 3】

請求項 1 (iii) または 2 (iii) に記載の機能的等価物であって、且つ配列番号：6または配列番号：8に記載のアミノ酸配列と相同であり、シスチンノットフォールドサイトカイン活性、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの活性を有することを特徴とする、ポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 - 3 のいずれか 1 項記載のフラグメントまたは機能的等価物であって、且つ配列番号：6もしくは配列番号：8に記載のアミノ酸配列またはそれらの活性なフラグメントと35%を超える配列同一性、好ましくは40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%または99%を越える配列同一性を有する、ポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 1 - 4 のいずれか 1 項記載の機能的等価物であって、配列番号：6または配列番号：8に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドと顕著な構造的相同性を示す、ポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1、2 または 4 のいずれか 1 項記載のフラグメントであって、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項の (i) に記載のポリペプチドと共通の抗原決定基を有し、配列番号：6または配列番号：8に記載のアミノ酸配列に由来する7つまたはそれ以上のアミノ酸残基から成るポリペプチド。

【請求項 7】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをコードする、精製核酸分子。

【請求項 8】

配列番号：5に記載の核酸配列を含む請求項 7 記載の精製核酸分子、またはその余剰的等価物もしくはフラグメント。

【請求項 9】

配列番号：5に記載の核酸配列から成る請求項 7 記載の精製核酸分子、またはその余剰的等価物もしくはフラグメント。

【請求項 10】

配列番号：5に記載の核酸配列のヌクレオチド152 - 721 (配列番号：11) を含む、請求項 7 記載の精製核酸分子。

【請求項 11】

配列番号：5に記載の核酸配列のヌクレオチド152 - 721 (配列番号：11) から成る、請求項 7 記載の精製核酸分子。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

配列番号：5 に記載の核酸配列のヌクレオチド218 - 721 (配列番号：9) を含む、請求項 7 記載の精製核酸分子。

【請求項 1 3】

配列番号：5 に記載の核酸配列のヌクレオチド218 - 721 (配列番号：9) から成る、請求項 7 記載の精製核酸分子。

【請求項 1 4】

高いストリンジェンシー条件下で請求項 8 - 1 3 のいずれか 1 項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 8 - 1 4 のいずれか 1 項記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載のベクターで形質転換されている宿主細胞。

【請求項 1 7】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと特異的に結合し、且つ好ましくは前記ポリペプチドのシスチンノットフォールドサイトカイン活性、好ましくはDANサブファミリー活性を阻害する、リガンド。

【請求項 1 8】

抗体である、請求項 1 7 記載のリガンド。

【請求項 1 9】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの発現レベルもしくは活性レベルを増加または低下させる化合物。

【請求項 2 0】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの生物学的作用のいずれをも誘発することなく、前記ポリペプチドと結合する、請求項 1 9 記載の化合物。

【請求項 2 1】

天然または改変されている、基質、リガンド、酵素、レセプターまたは構造的もしくは機能的模倣物である、請求項 2 0 記載の化合物。

【請求項 2 2】

疾患の治療または診断に使用するための、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 7 - 1 4 のいずれか 1 項記載の核酸分子、請求項 1 5 記載のベクター、請求項 1 6 もしくは 1 7 に記載のリガンド、または請求項 1 9 - 2 1 のいずれか 1 項記載の化合物。

【請求項 2 3】

患者由来の組織において、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載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、または請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの活性を評価すること；および前記発現レベルまたは活性をコントロールレベルと比較すること；を含み、このとき前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆している、患者の疾患を診断する方法。

【請求項 2 4】

in vitroで実施される、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

(a) 請求項 1 7 または 1 8 記載のリガンドを、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適する条件下で生物学的サンプルと接触させる工程；および

(b) 前記複合体を検出する工程；
を含む請求項 2 3 または 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

(a) 患者由来の組織サンプルを核酸プローブと、請求項 7 - 1 4 のいずれか 1 項記載の核酸分子と前記プローブとの間でハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェ

10

20

30

40

50

ントな条件下で接触させる工程；

(b) コントロールサンプルを、工程(a)で用いられるのと同じ条件下で前記プローブと接触させる工程；および

(c) 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、このときコントロールサンプルのハイブリッド複合体のレベルと異なる患者サンプルのハイブリッド複合体レベルの検出は疾患を示唆している、請求項23または24記載の方法。

【請求項27】

(a) 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7-14のいずれか1項記載の核酸分子と前記プライマーとの間で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；

(b) コントロールサンプルを、工程(a)で用いられるのと同じ条件下で前記プライマーと接触させる工程；

(c) 前記サンプルの核酸を増幅させる工程；および、

(d) 患者サンプルおよびコントロールサンプルの両サンプルから、増幅核酸レベルを検出する工程、

を含み、このときコントロールサンプルの増幅核酸レベルと顕著に異なる患者サンプルの増幅核酸レベルの検出は疾患を示唆している、請求項23または24記載の方法。

【請求項28】

(a) 疾患について検査される患者から、組織サンプルを入手する工程；

(b) 前記組織サンプルから、請求項7-9のいずれか1項記載の核酸分子を単離する工程；および、

(c) 疾患に附随する変異の存在を前記疾患の指標として前記核酸分子中で検出することによって、疾患について患者を診断する工程；

を含む請求項23または24記載の方法。

【請求項29】

核酸分子を増幅させて増幅産物を生成し、前記増幅産物で変異の有無を検出することをさらに含む、請求項28記載の方法。

【請求項30】

該核酸分子を、前記分子にハイブリダイズする核酸プローブとストリンジェントな条件下で接触させて、疾患に附随する変異に対応する任意の部分に前記核酸プローブの非ハイブリダイズ部分を有するハイブリッド二本鎖分子を形成させること；および

疾患に附随する変異の有無の指標として前記プローブ鎖の非ハイブリダイズ部分の有無を検出すること；

によって、前記患者における変異の有無を検出する請求項28または29の方法。

【請求項31】

疾患が、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態である、請求項23-30のいずれか1項記載の方法。

【請求項32】

分泌タンパク質としての、請求項1-6のいずれか1項記載のポリペプチドの使用。

【請求項33】

サイトカインとしての、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインとしての、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインのDANサブファミリーのメンバーとしての、請求項1-6のいずれか1項記載のポリペプチドの使用。

【請求項34】

請求項1-6のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項7-14のいずれか1項記載の核酸分子、請求項15記載のベクター、請求項17もしくは18記載のリガンド、または請求項19-21のいずれか1項記載の化合物を含む、医薬組成物。

【請求項35】

請求項1-6のいずれか1項記載のポリペプチドまたは請求項7-14のいずれか1項

10

20

30

40

50

記載の核酸分子を含む、ワクチン組成物。

【請求項 36】

細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態の治療用医薬品の製造で使用される、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 7 - 14 のいずれか 1 項記載の核酸分子、請求項 15 記載のベクター、請求項 17 もしくは 18 記載のリガンド、請求項 19 - 21 のいずれか 1 項記載の化合物、または請求項 34 記載の医薬組成物。

【請求項 37】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチド、請求項 7 - 14 のいずれか 1 項記載の核酸分子、請求項 15 記載のベクター、請求項 17 もしくは 18 記載のリガンド、請求項 19 - 21 のいずれか 1 項記載の化合物、または請求項 34 記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、患者の疾患を治療する方法。

10

【請求項 38】

疾患にかかっている患者での天然遺伝子の発現またはポリペプチドの活性が健常な対象者での発現または活性レベルと比較する場合に低い疾患に対して、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、化合物または組成物がアゴニストである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

疾患にかかっている患者での天然遺伝子の発現またはポリペプチドの活性が健常な対象者での発現または活性レベルと比較する場合に高い疾患に対して、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、化合物または組成物がアンタゴニストである、請求項 37 に記載の方法。

20

【請求項 40】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの発現もしくは活性レベルまたは請求項 7 - 14 のいずれか 1 項記載の核酸分子の発現レベルを、前記患者由来の組織においてある期間にわたってモニターすることを含む、患者において疾患の治療をモニターする方法であって、前記期間にわたる発現または活性のレベルがコントロールレベルに対して変化することは前記疾患の退行の指標である、前記方法。

30

【請求項 41】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドまたは請求項 7 - 14 のいずれか 1 項記載の核酸分子を、前記ポリペプチドまたは核酸分子に対し結合親和性を有すると疑われる 1 つまたは 2 つ以上の化合物と接触させること；および、前記核酸分子またはポリペプチドと特異的に結合する化合物を選択すること；を含む、疾患の治療および/または診断で有効な化合物を同定する方法。

【請求項 42】

請求項 7 - 14 のいずれか 1 項記載の核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズ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；および疾患の診断を容易にするために前記プローブおよびプライマーを使用するための指示を含む、疾患の診断に有用なキット。

40

【請求項 43】

ハイブリダイズしない RNA を消化するための薬剤を保有する第三の容器をさらに含む、請求項 42 のキット。

【請求項 44】

核酸分子のアレイを含むキットであって、前記核酸分子の少なくとも 1 つが請求項 7 - 14 のいずれか 1 項記載の核酸分子である前記キット。

【請求項 45】

請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと結合する 1 つまたは 2 つ以上の抗体、およ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。

50

【請求項 4 6】

形質転換されており、請求項 1 - 6 のいずれか 1 項記載のポリペプチドをより高いレベルで又はより低いレベルで発現する、または発現しない、非ヒトトランスジェニック動物または非ヒトノックアウト動物。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 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ること、および前記動物の疾患に対する前記化合物の作用を決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】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、本明細書においてシスチン-ノットフォールド(cystine knot fold)サイトカインスーパーファミリーのDanファミリーのメンバーである分泌タンパク質として同定された新規なタンパク質(INSPO02)に関し、さらに疾患の診断、予防および治療におけるこのタンパク質およびそのコード遺伝子に由来する核酸配列の使用に関する。

本明細書に引用した全ての刊行物、特許および特許出願は、引用により完全に本明細書に含まれるものとする。

【背景技術】

【0002】

薬剤の発見プロセスにおいて、機能ゲノム学の時代の到来にあわせて根幹的な革命が現在進行している。“機能ゲノム学”という用語は、対象のタンパク質配列に機能を帰属させるためにバイオインフォマティクスツールを利用するアプローチに用いられる。そのようなツールは、配列データの生成速度が、これらタンパク質配列に機能を割り当てる研究室の能力をはるかに越えるのでますます必要性を増している。

20

バイオインフォマティクスツールの潜在能力および精度が高まっているために、前記ツールは通常の生化学的特徴付け技術と急速に置き換えられつつある。実際、本発明の同定に用いた高度なバイオインフォマティクスツールは、今や、高い信頼性をもつ結果を出力する能力を有する。

配列データが利用可能になるにつれ、種々の研究機関および企業組織がそれらを調査し、重要な発見が絶え間なく達成され続けている。しかしながら、研究および薬剤発見のための標的として、更なる遺伝子およびそれらがコードするポリペプチドを同定し特徴付ける必要性は引き続き存在している。

30

【0003】

(分泌タンパク質の背景技術)

細胞外タンパク質を生成および分泌する細胞の能力は、多くの生物学的過程の中核である。酵素、増殖因子、細胞外マトリックスタンパク質およびシグナル伝達分子は、すべて細胞によって分泌される。前記過程は、分泌小胞と形質膜との融合を介する。全てではないが、多くの場合、タンパク質は、シグナルペプチドによって小胞体に導かれて分泌小胞内へ導かれる。シグナルペプチドは、細胞質から分泌小胞のような膜結合区画へのポリペプチド鎖輸送に作用するcis-作動性配列である。分泌小胞へ導か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、または形質膜に保持される。形質膜に保持されるポリペプチドは、1つまたは2つ以上の膜貫通ドメインを有するであろう。細胞の機能で中核的役割を果たす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(粘着分子)、プロテアーゼ、並びに増殖因子および分化因子である。

40

増殖因子は、in vivoおよびin vitro両方において細胞増殖を誘導する特性を共有するポリペプチドの比較的大きなグループを表している。増殖因子は、2つの重要な様式において、インスリンまたは成長ホルモンのような古典的内分泌ホルモンと異なっている。第一に、内分泌ホルモンは典型的には特殊化された腺(例えば、インスリンの場合は膵臓のように)で合成され、一方、増殖因子は多くの場合、多様な種類の細胞および組織で合成される。第二に、古典的な内分泌ホルモンは、合成部位で体液中に放出されて、血流でそ

50

これらの標的組織に運ばれる。増殖因子の顕著な特徴は、ほとんどの場合、それらが合成された組織内で局所的に作用するということである（以下の文献で概括されている：J.K. Heath (1993) *Growth Factors*, Oxford University Press, Oxford, UK, pp.15-33）。

【0004】

増殖因子間の配列類似性の程度は高くはないが、増殖因子はそれらの構造的および機能的類似性を基準にしてスーパーファミリーに分類され得る。これらのスーパーファミリーの例には、以下のものが挙げられる：(a) 造血性増殖因子、例えば成長ホルモン、IL-2、IL-4、G-CSFおよびCNTF、これらは全て4-ヘリックス-バンドル構造的モチーフを有する；(b) トレフォイル(trefoil)ファミリーメンバー、例えばIL-1、IL-1、FGFおよび角化細胞増殖因子；(c) EGF様増殖因子、例えばEGFおよびTGF、これらは全て免疫グロブリン様ドメインを有する；および(d) シスチン-ノット増殖因子フォールド、これにはNGF、TGF、PDGFおよび糖タンパク質ホルモンが含まれる。

増殖因子は、細胞外性であって、生物学的作用を発揮するために、標的細胞の細胞膜上に位置する特異的な高親和性レセプターと相互作用する。種々の多様な増殖因子レセプターの分子の特徴付けによって、前記増殖因子レセプターは、次の規定されているファミリーに分類されることが明らかになっている：チロシンキナーゼレセプター、G-タンパク質結合型7回膜貫通レセプター、およびセリン/スレオニンキナーゼレセプター。チロシンキナーゼレセプターは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインによって特徴付けられ、チロシンキナーゼ活性を有する。セリン/スレオニンキナーゼ増殖因子レセプターは、チロシンキナーゼレセプターに類似しており、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを有する。セリン/スレオニンキナーゼ増殖因子レセプターの細胞内ドメインは、内在性(intrinsic)のセリン/スレオニンキナーゼ活性を有する。

増殖因子の脱調節は種々の疾患状態に関与しており、前記疾患には腫瘍学的疾患(M. B. artucci et al., (2001) *Cancer Res.* Sep15; 61(18): 6747-54; S. Dias et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Sep11; 98(19): 10857-62; B. Djavan et al., (2001) *World J. Urol.* 19(4): 225-33)、炎症性疾患(C. Fiocchi (2001) *J. Clin. Invest.* Aug; 108(4): 523-6; S. Hodge et al., (2001) *Respirology* Sep; 6(3): 205-211; S. A. Fenwick et al., (2001) *J. Anat.* Sep; 199(Pt3): 231-40)、神経学的疾患(J.D. Cooper et al., (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(18): 10439-44; M. Fahnstock et al., (2001) *Mol. Cell. Neurosci.* 18(2)210-20)、および代謝性疾患(M.H. Vickers et al., (2001) *Endocrinology* 142(9): 3964-73)が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0005】

(シスチンノットフォールドスーパーファミリー)

シスチンノットスーパーファミリーにみられる典型的な構造は、3つのジスルフィド結合を生じる6つのシステイン残基の存在に基づいている。前記ジスルフィド結合の2つは“リング様”構造を作り、その“リング様”構造を第三のジスルフィド結合が貫通している(Sun et al. 1995)。シスチンノットドメインは、6つを超えるシステイン残基を有することがしばしば見出されている。余分なシステイン残基は通常、ダイマー化の間に、シスチンノットドメインまたは鎖間ジスルフィド結合の内部に更なるジスルフィド結合を生成することに用いられる。

このシスチンノットスーパーファミリーはサブファミリーに分けられており、前記サブファミリーには次のものが挙げられる：糖タンパク質ホルモン(例えば卵胞刺激ホルモン)；トランスフォーミング増殖因子(TGF)タンパク質(例えば骨形成タンパク質4)；血小板由来増殖因子様(PDGF様)タンパク質(例えば血小板由来増殖因子A)；神経成長因子(NGF)(例えば脳由来神経栄養因子)；および、神経芽細胞腫におけるディファレンシャルスクリーニング選定遺伝子異常(differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma)(DAN)ファミリー(例えばケルベロス(cerberus))。前記DANサブファミリーにはCer1、ケルベロス、カロンテ(Caronte)、Drm/グレムリン(Gremelin)、PRDC、DAN、ダンテ(Dante)およびCeCan1が含まれる(Massague et al. *Genes D*

ev. (2000)Mar15; 14(6): 627-44; Massague & Wotton, EMBO J. (2000) Apr17; 19(8): 1745-54)。

DANサブファミリーのメンバーがTGFβサブファミリーのタンパク質メンバーの作用を調節し得ると考えられている(Pearce et al., Dev. Biol. (1999) May 1; 209(1): 98-110)。より具体的には、DANサブファミリーのメンバーが、発生の中の骨形成タンパク質(BMP)の作用を調節し得る可能性がある。

【0006】

DANサブファミリーのメンバーは、シスチンノットスーパーファミリーのTGFβサブファミリーのメンバーである骨形成タンパク質(BMP)のアンタゴニストとして作用することが見出されている(Stanley et al., Mech. Dev. (1998) Oct; 77(2): 173-84; Massague et al., (2000) 上掲書; J. Massague & D. Wotton (2002)上掲書)。BMPモノマーは、細胞表面レセプターと相互作用する前に、そのシスチンノットドメインの結合を介して、ホモダイマー化またはヘテロダイマー化する。DANサブファミリーのメンバーは、自身のシスチンノットドメインを介してBMPと結合することができると考えられている。このことによって、BMPがその天然のダイマー化パートナーと結合するのを妨げられ、結果としてBMPはもはや、そのBMPの細胞表面シグナル伝達レセプターと相互作用することが不可能となる。具体的にはDAN、Cer1およびDRMを調べる実験によって、DAN、Cer1およびDRMはBMP4の作用を阻害することが示されている(Pearce et al. 1999, 上掲書)。

ケルベロスの機能についてのより深い理解は、結合研究の結果として得られている(S. Piccolo et al., Nature 1999 Feb25; 397(6721): 707-10)。ケルベロスに関して実施された最初の機能研究では、アフリカツメガエルのケルベロスタンパク質(cer)が用いられた。アフリカツメガエルのケルベロスmRNAのアフリカツメガエル胚へのマイクロインジェクションによって、cerタンパク質はシュベーマンの形成体の前方の内胚葉において異所性頭部の形成を誘導したことが明らかにされた(Bouwmeester et al. Nature 1996 Aug15; 382(6592): 595-601; T. Bouwmeester, Int. J. Dev. Biol. 2000 145(1 Spec No): 251-8)。Piccoloと共同研究者らによって実施された結合研究により、アフリカツメガエルのケルベロスタンパク質は、独立な部位を介して、Nodalタンパク質、BMPタンパク質およびWntタンパク質と結合し、これらの作用を阻害することが明らかにされた。より具体的には、前記研究者らは、ケルベロスがXnr-1(Nodalファミリーのメンバー)、BMP4(BMPファミリーのメンバー)およびXwnt-8(Wntファミリーのメンバー)に対し高度な特異的親和性および阻害作用を有することを発見した。この研究は、ケルベロス、ひいてはDANファミリーの他のメンバーと、発生経路および組織分化経路とを結び付けている。

【0007】

遺伝子SOSTによってコードされているスクレロスティン(sclerostin)も、DANサブファミリーのメンバーである(Brumkow et al., 2001 Am. J. Hum. Genet. 68: 577-589)。SOSTは、スクレロステオーシス(sclerosterosis)(常染色体性劣性硬化性骨形成異常)と関連している。スクレロステオーシスが付随する表現型は進行性の骨異常成長であり、巨人症、顔面の歪み並びに7番目および8番目の脳神経のエントラップメントをもたらす(Brumkow et al. 2001, 上掲書)。スクレロステオーシスとSOSTとの間の関連は、この疾患に冒されている家系でのホモ接合性マッピングにより決定された。Brumkowとその共同研究者らは、スクレロステオーシスに付随する表現型と他のDANサブファミリーメンバーに付随する影響との間の類似性を同定した。この関連は、TGFβサブファミリーメンバー、より具体的にはBMPの負の調節物質の損失のためにスクレロステオーシスが起り得るという示唆によって、一層強められた。

従って分泌タンパク質の同定、特にシスチンノットフォールドスーパーファミリーのメンバーのような増殖因子の同定、また特にDANサブファミリーのメンバーの同定は、上述する疾患状態および付随する症状をもたらす根本的経路についての理解を高める上で、またそれら疾患を治療するのにより効果的な遺伝子療法または薬物療法を開発する上で、極めて重要である。

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【0008】

本発明は、INSP035タンパク質が、分泌タンパク質として機能し、さらにシスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのDANサブファミリーの分泌タンパク質として機能するという発見を基にしている。

本発明の第一の特徴では、本発明はポリペプチドを提供し、前記ポリペプチドは、

(i) 配列番号：2、配列番号：4、または配列番号：7に記載のアミノ酸配列を含む；

(ii) 分泌タンパク質機能、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのメンバー、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの機能を有する(i)のポリペプチドフラグメントであるか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する(i)のポリペプチドフラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的等価物である。

好ましくは、本発明の第一の特徴のポリペプチドは、

(i) 配列番号：6または配列番号：8に記載のアミノ酸配列を含む；

(ii) 分泌タンパク質機能、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのメンバー、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの機能を有する(i)のポリペプチドフラグメントであるか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する(i)のポリペプチドフラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的等価物である。

本発明の前記第一の特徴の更なる態様によると、ポリペプチドが提供され、前記ポリペプチドは、

(i) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：7または配列番号：8に記載のアミノ酸配列から成る；

(ii) 分泌タンパク質機能、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのメンバー、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの機能を有する(i)のポリペプチドフラグメントであるか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する(i)のポリペプチドフラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的等価物である。

【0009】

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“INSP002エクソン1ポリペプチド”と称する。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“INSP002エクソン2ポリペプチド”と称する。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“INSP002ポリペプチド”と称する。INSP002エクソン1ポリペプチドの最初の22アミノ酸はシグナルペプチドであり、前記シグナル配列をもたないINSP002ポリペプチド配列は配列番号：7および配列番号：8に記載されている。配列番号：7に記載の配列を有するポリペプチドは、以下では“シグナルペプチドをもたないINSP002エクソン1ポリペプチド”と称する。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“シグナルペプチドをもたないINSP002ポリペプチド”と称する。

本発明の第一の特徴の更なる態様によると、ポリペプチドが提供され、前記ポリペプチドは、

(i) 配列番号：14に記載のアミノ酸配列を含むか、もしくは配列番号：14に記載のアミノ酸配列から成る；

(ii) 分泌タンパク質機能、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのメンバー、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの機能を有する(i)のポリペプチドフラグメントであるか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する(i)のポリペプチドフラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的等価物である。

【0010】

配列番号：14に記載の配列を有するポリペプチドは、INSP002ポリペプチドの変種である。前記変種は、INSP002ポリペプチドと比較して107番目および108番目の位置に2つのアミノ酸欠失と110番目の位置に一アミノ酸置換とを有するというものを除いて、INSP002

10

20

30

40

50

ポリペプチドと同一である。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“変種INSP002ポリペプチド”と称する。

好ましくは、本発明の第一の特徴のポリペプチドは、シスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのメンバーとして、好ましくはDANサブファミリーのメンバーとして機能する。“シスチンノットフォールドサイトカイン”という用語は本技術分野では周知であって、当業者であれば、あるポリペプチドがシスチンノットフォールドサイトカインスーパーファミリーのメンバーとして機能するか否かを、本技術分野で公知の種々のアッセイを用いて容易に確かめることができるであろう。

特に、当業者は、あるポリペプチドがTGFスーパーファミリーメンバーのアンタゴニストであるか否か、特にBMPアンタゴニストであるか否かをアッセイすることによって、そのポリペプチドがDANサブファミリーのメンバーとして機能するか否かを容易に確かめることができるであろう。いくつかのBMPがアフリカツメガエルの胚で発現されることから、ポリペプチドがBMPアンタゴニストとして機能するか否かをアッセイするための系としてアフリカツメガエル胚を用いることができる(C. Chang et al., 1999, Development 126: 3347-3357; S. Hawley et al., 1995, Genes Dev. 9: 2923-2935; A. Hemmati-Brivanlou & G.H. Thomsen, 1995, Dev. Genet. 17: 78-89; C.M. Jones et al., 1992, Development 115: 639-647)。初期中胚葉におけるBMP-2/4クラスまたはBMP-7クラスのシグナルの過剰発現は腹部原基を誘導するが、一方前記シグナルの阻害剤(例えばノギン(Noggin)、Xnr3、コーディン(Chordin)またはフォリスタチン)は背部原基を誘導する。したがって、胚の発生に対するあるポリペプチドの効果は、そのポリペプチドがBMPアン

10

20

【0011】

本明細書で用いられる“INSP002ポリペプチド”という用語には、INSP002エクソン1ポリペプチド、シグナルペプチドをもたないINSP002エクソン1ポリペプチド、INSP002エクソン2ポリペプチド、INSP002ポリペプチドまたはシグナルペプチドをもたないINSP002ポリペプチドを含むポリペプチド；および、INSP002エクソン1ポリペプチド、シグナルペプチドをもたないINSP002エクソン1ポリペプチド、INSP002エクソン2ポリペプチド、INSP002ポリペプチド、シグナルペプチドをもたないINSP002ポリペプチドまたは変種INSP002ポリペプチドから成るポリペプチド；が含まれる。

第二の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする精製核酸分子を提供する。

30

好ましくは、前記精製核酸分子が、配列番号：1に記載の核酸配列(INSP002エクソン1ポリペプチドをコードする)、配列番号：3に記載の核酸配列(INSP002エクソン2ポリペプチドをコードする)、配列番号：5に記載の核酸配列(INSP002ポリペプチドをコードする)もしくは配列番号：13に記載の核酸配列(変種INSP002ポリペプチドをコードする)を含むか、またはこれら配列のいずれかの余剰的(redundant)等価物またはフラグメントである。

【0012】

本発明はさらに、配列番号：1に記載の核酸配列(INSP002エクソン1ポリペプチドをコードする)、配列番号：3に記載の核酸配列(INSP002エクソン2ポリペプチドをコードする)、配列番号：5に記載の核酸配列(INSP002ポリペプチドをコードする)もしくは配列番号：13に記載の核酸配列(変種INSP002ポリペプチドをコードする)から成る精製核酸分子か、またはこれら配列のいずれかの余剰的等価物またはフラグメントである精製核酸分子を提供する。

40

本発明のこの特徴のある態様によると、前記精製核酸分子は、INSP002エクソン1ポリペプチドをコードする核酸配列およびINSP002ポリペプチドをコードする核酸配列の上流に位置する5'非翻訳領域(配列番号：1および配列番号：5のヌクレオチド1-151)を含まない。この態様によると、前記精製核酸分子は、好ましくは配列番号：1のヌクレオチド152-475、または配列番号：5のヌクレオチド152-721を含む。本発明はさらに、配列番号：1のヌクレオチド152-475、または配列番号：5のヌクレオチド152-721から成る

50

精製核酸分子を提供する。5'非翻訳領域を含まないINSP002ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は配列番号：11で示されており、5'非翻訳領域を含まないINSP002エクソン1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（配列番号：1のヌクレオチド152 - 475）は配列番号：12で示されている。

【0013】

この特徴の更なる態様によると、前記精製核酸分子は、INSP002エクソン1ポリペプチドおよびINSP002ポリペプチドの開始部分に位置するシグナルペプチド（配列番号：1および配列番号：5のヌクレオチド152 - 217）をコードしない。この態様によると、前記精製核酸分子は、好ましくは配列番号：1のヌクレオチド218 - 475（シグナルペプチドをもたないINSP002エクソン1ポリペプチドをコードする）、または配列番号：5のヌクレオチド218 - 721（シグナルペプチドをもたないINSP002ポリペプチドをコードする）を含む。本発明はさらに、配列番号：1のヌクレオチド218 - 475（シグナルペプチドをもたないINSP002エクソン1ポリペプチドをコードする）、または配列番号：5のヌクレオチド218 - 721（シグナルペプチドをもたないINSP002ポリペプチドをコードする）から成る精製核酸分子を提供する。成熟INSP002ポリペプチド（配列番号：7）をコードするヌクレオチド配列は配列番号：9で示されており、成熟INSP002エクソン1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は配列番号：10で示されている。

10

【0014】

本発明のこの特徴の更なる態様によると、前記精製核酸分子は、変種INSP002ポリペプチドをコードする核酸配列の上流に位置する5'非翻訳領域（配列番号：13のヌクレオチド1 - 68）を含まない。この態様によると、前記精製核酸分子は、好ましくは配列番号：13のヌクレオチド69 - 719を含むか、または配列番号：13のヌクレオチド69 - 719から成る。5'非翻訳領域をもたない変種INSP002ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（配列番号：13のヌクレオチド69 - 719）は配列番号：15で示されている。

20

第三の特徴では、高ストリンジェンシー条件下で本発明の第二の特徴の核酸分子とハイブリダイズする精製核酸分子を提供する。

第四の特徴では、本発明は、本発明の第二または第三の特徴の核酸分子を含むベクター、例えば発現ベクターを提供する。

第五の特徴では、本発明は、本発明の第四の特徴のベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

30

第六の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと特異的に結合し、且つ好ましくは前記ポリペプチドのシスチンノットフォールドサイトカイン活性を抑制するリガンドを提供する。好ましくは、前記リガンドは、シスチンノットフォールドサイトカインのDANサブファミリーのメンバーである本発明の第一の特徴のポリペプチドの機能を抑制する。本発明のポリペプチドに対するリガンドは種々の形態で供給されてもよく、そのような形態には、天然もしくは改変されている、基質、酵素、レセプター、有機小分子（例えば2000Daまでの、好ましくは800Daもしくはそれ未満の天然または合成有機小分子）、ペプチド摸倣物、無機分子、ペプチド、ポリペプチド、抗体、これら物質の構造的もしくは機能的摸倣物が含まれる。

第七の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させるか、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節するのに有効な化合物を提供する。

40

本発明の第七の特徴の化合物は、前記ポリペプチドの遺伝子発現レベルまたは活性を増加させ得るか（アゴニスト作用）、または低下させ得るか（アンタゴニスト作用）。重要なことに、INSP002ポリペプチドの機能を同定することによって、疾患の治療および/または診断に有効な化合物を同定し得るスクリーニング方法のデザインが可能になる。

【0015】

第八の特徴では、本発明は、診断または治療で使用するために、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の

50

化合物を提供する。これらの分子はまた、細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態を治療する医薬品の製造においても用いることができる。

第九の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴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または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性レベルを前記患者由来の組織で評価する工程、および前記発現または活性レベルをコントロールレベルと比較する工程を含む患者の疾患を診断する方法を提供し、この場合前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示している。前記の方法は、好ましくは *in vitro* で実施されるであろう。同様な方法は、患者における疾患の治療的処置のモニタリングに使用され得る。この場合、時間の経過にしたがってポリペプチドまたは核酸分子の発現もしくは活性レベルがコントロールレベルに向かって変化することは、疾患の緩解を示している。

10

本発明の第九および第十番目の特徴における障害または疾患は、シスチンノットフォールドサイトカインの異常なレベル、好ましくは DAN サブファミリーのメンバーの異常なレベルが関与している障害または疾患であるのが好ましい。前記障害または疾患は、シスチンノットフォールドサイトカインのリガンドの異常なレベル、好ましくは DAN サブファミリーのメンバーのリガンドの異常なレベルが関与しているものであってもよい。例えば前記障害または疾患は、TGF β スーパーファミリーメンバーの異常なレベルが関与しているものであり得る。特に、前記障害または疾患は、BMP が関与しているもの、例えば神経障害、糖尿病性腎障害のような腎障害、癌、創傷治癒、線維症、骨減少症、骨粗しょう症、骨折およびスクレロステオーシスであり得る。

20

【0016】

本発明の第一の特徴のポリペプチドを検出する好ましい方法は、以下の工程を含む：(a) 本発明の第六の特徴のリガンド（例えば抗体）と生物学的サンプルとを、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；および (b) 前記複合体を検出する工程。

本発明の第九の特徴によると、例えば短いプローブによる核酸ハイブリダイゼーション法、点変異分析、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅、および、抗体を用いて異常なタンパク質レベルを検出する方法といった種々の異なる方法が存在することは、当業者には明らかであろう。同様な方法を短期または長期ベースで用いて、モニターされる疾患の治療を可能にすることができる。本発明はまた、前記疾患診断方法に有用なキットも提供する

30

【0017】

第十番目の特徴では、本発明は、分泌タンパク質としての本発明の第一の特徴のポリペプチドの使用を提供する。好ましくは、本発明は、サイトカインとしての、より好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインとしての、特にシスチンノットフォールドサイトカインの DAN サブファミリーのメンバーとしての、本発明の第一の特徴のポリペプチドの使用を提供する。

第十一の特徴では、本発明は医薬組成物を提供し、前記医薬組成物は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第五の特徴の宿主細胞、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を医薬的に許容できる担体と組合わせて含有する。

40

第十二番目の特徴では、本発明は、疾患の診断または治療を目的とする医薬品の製造で使用するために、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第五の特徴の宿主細胞、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を提供する。

第十三の特徴では、本発明は患者の疾患を治療する方法を提供し、前記方法は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明

50

の第七の特徴の化合物を患者に投与することを含む。

本発明の第十二番目および第十三番目の特徴における疾患は、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカイン、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの異常なレベルが関与している疾患である。前記疾患はまた、シスチンノットフォールドサイトカインのリガンドの異常なレベル、好ましくはDANサブファミリーのメンバーのリガンドの異常なレベルが関与しているものであってもよい。例えば前記疾患は、TGF スーパーファミリーメンバーの異常なレベルが関与しているものであり得る。特に、前記疾患または障害は、BMPが関与しているもの、例えば神経障害、糖尿病性腎障害のような腎障害、癌、創傷治癒、線維症、骨減少症、骨粗しょう症、骨折およびスクレロステオーシスであろう。

【0018】

本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性が、健常な対象者の発現または活性レベルと比較したとき罹患対象者で低下する疾患については、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、リガンドまたは化合物がアゴニストであるべきである。逆に、前記天然の遺伝子の発現、または前記ポリペプチドの活性が、健常な対象者の発現または活性レベルと比較したとき罹患対象者で上昇する疾患については、前記患者に投与される前記ポリペプチド、核酸分子、リガンドまたは化合物がアンタゴニストであるべきである。前記アンタゴニストの例にはアンチセンス核酸分子、リボザイムおよびリガンド(例えば抗体)が含まれる。

10

第十四番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドを高レベルで、または低レベルで発現させるために、または全く発現させないように形質転換したトランスジェニックまたは遺伝子ノックアウト非ヒト動物を提供する。前記トランスジェニック動物は、疾患の研究用モデルとして非常に有用であり、さらに前記疾患の治療または診断に有効な化合物の同定を目的とするスクリーニング方法で用いることもできる。

20

【0019】

本発明を利用するために用いることができる標準的な技術および方法の要旨は、下記で提供される。本発明は、記載される特定の方法論、プロトコル、細胞株、ベクターおよび試薬に限定されないことは理解されよう。本明細書で用いられる専門用語は単に個々の態様を説明するためのものであり、前記用語によって本発明の範囲を限定しようとするものではないこともまた理解されよう。本発明の範囲は添付の請求の範囲の用語によってのみ

30

限定される。

本明細書では、ヌクレオチドおよびアミノ酸についての標準的な略語が用いられる。

本発明の実施では別に指示がなければ、分子生物学、微生物学、リコンビナントDNA技術および免疫学の通常の技術が用いられるであろう。前記技術は当業者の技術範囲内である。

前記のような技術は、文献で完全に説明されている。特に適切な解説書の例には以下が含まれる： Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (1989); DNA Cloning, Vol. I and II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the Methods in Enzymology series (Academic Press, Inc.)特にVol. 154 & 155; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Walker, eds. 1987, Academic Press, London); Scopes, (1987) Protein Purification: Principles and Practice, Second Edition (Springer Verlag, NY); および Handbook of Experimental Immunology, Vols. I - IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds. 1986)。

40

【0020】

50

本明細書において用いる“ポリペプチド”という用語は、ペプチド結合または改変ペプチド結合によって互いに結合した2つまたは3つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。前記改変ペプチド結合によるものは、すなわちペプチドイソスターである。この用語は、短鎖（ペプチドおよびオリゴペプチド）および長鎖（タンパク質）の両方を指す。

本発明のポリペプチドは成熟タンパク質の形態を有するものでもよく、またプレ-、プロ-またはプレプロ-タンパク質であってプレ-、プロ-またはプレプロ-部分の切断によって活性化されて活性な成熟ポリペプチドを生じるタンパク質でもよい。そのようなポリペプチドでは、プレ-、プロ-またはプレプロ-配列がリーダー配列もしくは分泌配列であっても、または成熟ポリペプチド配列の精製のために用いられる配列であってもよい。

本発明の第一の特徴のポリペプチドは、融合タンパク質の一部を形成することができる。例えば、1つまたは2つ以上の付加アミノ酸配列を含むことがしばしば有利である。前記付加アミノ酸配列は、分泌もしくはリーダー配列、プロ-配列、精製に役立つ配列、または例えばリコンビナント形成の間により高いタンパク質安定性を付与する配列を含んでもよい。あるいは、または前記に加えて、前記成熟ポリペプチドを別の化合物、例えば前記ポリペプチドの半減期を増加させるような化合物（例えばポリエチレングリコール）と融合させることができる。

【0021】

ポリペプチドは、天然のプロセス（例えば翻訳後プロセッシング）によって、または本技術分野で周知の化学的改変技術によって改変された、20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。本発明のポリペプチドに一般的に存在する公知の改変には、グリコシル化、脂質付加、硫化、 α -カルボキシル化（例えばグルタミン酸残基の）、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化がある。他の可能な改変には、アセチル化、アシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質誘導体の共有結合付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、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、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク分解性プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、タンパク質へのトランスファー-RNA媒介性アミノ酸付加（例えばアルギニル化）およびユビキチン結合が含まれる。

改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシ末端を含むポリペプチド内のいずれの場所に存在してもよい。実際、共有結合改変によるポリペプチドのアミノ末端もしくはカルボキシ末端またはその両端の閉塞(blockage)は、天然に存在するポリペプチドおよび合成ポリペプチドで一般的であり、そのような改変は本発明のポリペプチドにも存在し得る。

【0022】

ポリペプチド内に生じる改変は、多くの場合ポリペプチドが生成される方法の関数であろう。組換えによって生成されるポリペプチドについて、改変の性質および程度は大部分が、特定の宿主細胞の翻訳後改変能力および問題のポリペプチドのアミノ酸配列に存在している改変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、異なる種類の宿主細胞間で変動する。

本発明のポリペプチドは、任意の適切な様式で調製することができる。そのようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド（例えば、細胞培養物から精製される）、組換え的に生成されたポリペプチド（融合タンパク質を含む）、合成的に生成されたポリペプチド、または前記方法の組合せによって生成されたポリペプチドが含まれる。

本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP002ポリペプチドと相同なポリペプチドであり得る。本明細書で用いる用語として、2つのポリペプチドは、前記ポリペプチドの一方の配列が他方のポリペプチドの配列に対して十分に高い同一性または類似性を有する場合、“相同である”と称される。“同一性”とは、アラインメントを施し

10

20

30

40

50

た配列のどの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で同一であることを示す。“類似性”は、アラインメントを施した配列のいずれの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で類似の種類であることを示す。同一性および類似性の度合いは、容易に計算できる(Computational Molecular Biology, A.M. Lesk ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, D.W. Smith ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, G. von Heinje, Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, M. Gribskov and J. Devereux eds., M. Stockton Press, New York, 1991)。

10

【0023】

したがって、相同なポリペプチドには、INSP002ポリペプチドの天然の生物学的変種(例えば前記ポリペプチドが由来した種における対立形質変種または地理的変種)および変異体(例えばアミノ酸置換、挿入または欠失を含む変異体)が含まれる。前記変異体は、1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸残基(好ましくは保存的アミノ酸残基)で置換されているポリペプチドを含んでもよく、さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝コードでコードされたものでもそうでなくてもよい。典型的な前記の置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間で; SerとThr間で; 酸性残基AspとGlu間で; AsnとGln間で; 塩基性残基LysとArg間で; または芳香族残基PheとTyr間で生じる。特に好ましいものは、いくつか(すなわち5から10、1から5、1から3、1から2、または単に1つ)のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失または付加された変種である。とりわけ好ましいものは、タンパク質の特性および活性を変化させないサイレント置換、付加および欠失である。また、その際とりわけ好ましいものは、保存的置換である。

20

前記変異体にはまた、1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が置換基を含むポリペプチドも含まれる。

【0024】

典型的には、2つのポリペプチド間で30%を越える同一性が、機能的等価物の指標であると考えられる。好ましくは、本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP002ポリペプチドまたはその活性なフラグメントと35%を越える配列同一性の度合いを有する。より好ましいポリペプチドは、それぞれ35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%または前記を越える同一性の度合いを有する。

30

本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドはまた、構造についてのアラインメントの1つまたは2つ以上の技術を用いて同定されたポリペプチドであってもよい。例えば、バイオペンジウム(Biopendium)検索データベースの作製に用いられる検索ツールの一角を構成するインファーマティカ=ゲノムスレッダー(Inpharmatica Genome Threader)技術を用いて(同時係属英国特許出願(PCT/GB01/01105)を参照されたい)、INSP002ポリペプチドに対して低い配列同一性しかもたないが、INSP002ポリペプチド配列との顕著な構造的相同性を共有するために、分泌分子活性を有すると予測される、現在のところ機能が未知のポリペプチドを同定することができる。“顕著な構造的相同性”とは、インファーマティカ=ゲノムスレッダーが、2つのタンパク質は10%以上の確実性を有して構造的相同性を共有すると予測することを意味する。

40

本発明の第一の特徴のポリペプチドはまた、INSP002ポリペプチドのフラグメント並びにINSP002ポリペプチドの機能的等価物のフラグメントを含むが、ただしこれらフラグメントがシスチンノットフォールドサイトカイン活性、好ましくはDANシスチンノットフォールドサブファミリーのメンバーの活性を保持するか、またはINSP002ポリペプチドと共通の抗原決定基を有することを条件とする。

【0025】

本明細書において用いる、“フラグメント”という用語は、INSP002ポリペプチドまたはその機能的等価物の1つのいずれかのアミノ酸配列の一部(全体ではないが)と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。前記フラグメントは、前記配列に由来する少な

50

くとも n 個の連続するアミノ酸を含むべきであり、さらに個々の配列に応じて n は好ましくは 7 またはそれより大きい (例えば 8、10、12、14、16、18、20 またはそれより大きい)。小さなフラグメントは、抗原決定基を構成することができる。

そのようなフラグメントは、“独立的存在 (free-standing)” (すなわち、他のアミノ酸もしくはポリペプチドの一部でもなく、他のアミノ酸もしくはポリペプチドの一部に融合されているのでもない) であってもよく、またはより大きなポリペプチドに含まれて、前記ポリペプチドの一部分または領域を形成してもよい。より大きなポリペプチドの内部に含まれている場合、本発明のフラグメントは、最も好ましくは連続するただ 1 つの領域を形成する。例えばある種の好ましい態様は、前記フラグメントのアミノ末端に融合したプレ-および/またはプロ-ポリペプチド領域を有するフラグメント、および/または前記フラグメントのカルボキシ末端に融合した付加的領域を有するフラグメントに関する。しかしながら、いくつかのフラグメントがただ 1 つのより大きなポリペプチドの内部に含まれていてもよい。

本発明のポリペプチドまたはその免疫原性フラグメント (少なくとも 1 つの抗原決定基を含む) を用いて、例えばポリクローナルまたはモノクローナル抗体といった、前記ポリペプチドに免疫特異的なリガンドを作製することができる。そのような抗体を用いて、本発明のポリペプチドを発現しているクローンを単離もしくは同定するか、またはアフィニティークロマトグラフィーで本発明のポリペプチドを精製することができる。前記抗体はまた、当業者には明らかなように、他の用途のうち診断的または治療的補助としても用いることができる。

【0026】

“免疫特異的” という用語は、前記抗体が、従来技術における他の近縁ポリペプチドに対する親和性よりも、本発明のポリペプチドに対して実質的に強い親和性を有することを意味する。本明細書で用いる“抗体” という用語は、完全な分子だけでなく問題の抗原決定基と結合することができるそのフラグメント、例えば Fab、F(ab')₂ および Fv も指す。したがって、そのような抗体は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと結合する。

“実質的に強い親和性” という用語は、既知の分泌タンパク質と比較して、本発明のポリペプチドに対する親和性において測定可能な増加が存在することを意味する。

好ましくは、前記親和性が、本発明のポリペプチドに対して、シスチンノットフォールドサイトカインおよび特に DAN サブファミリーのメンバーのような既知の分泌タンパク質に対するよりも少なくとも 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、1000 倍、 10^4 倍、 10^5 倍または 10^6 倍強い。

ポリクローナル抗体が所望される場合、選択される哺乳類 (例えばマウス、ウサギ、ヤギまたはウマ) が、本発明の第一の特徴のポリペプチドで免疫され得る。動物を免疫するために用いられるポリペプチドは、リコンビナント DNA 技術によって誘導されてもよく、または化学的に合成されてもよい。所望する場合には、前記ポリペプチドを担体タンパク質と結合させることができる。前記ポリペプチドと化学的に結合させることができる一般的に用いられ得る担体には、ウシ血清アルブミン、チログロブリンおよびキーホールリンペットヘモシアニンが含まれる。次に、前記担体結合ポリペプチドが用いられて、動物が免疫される。免疫した動物から血清が採集され、既知の方法 (例えばイムノアフィニティークロマトグラフィー) にしたがって処理される。

【0027】

本発明の第一の特徴のポリペプチドに対するモノクローナル抗体もまた、当業者は容易に生成できる。ハイブリドーマ技術を用いてモノクローナル抗体を作製する一般的な方法論は、周知である (例えば以下を参照されたい: G. Kohler & C. Milstein, Nature 256 : 495 - 497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4 : 72 (1983); Cole et al., 77 - 96 “Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy”, Alan R. Liss, Inc. (1985))。

本発明の第一の特徴のポリペプチドに対して生成されたモノクローナル抗体のパネル (panels) を種々の特性、すなわちアイソタイプ、エピトープ、親和性など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、それらを作らせた個々のポリペプチド

の精製に特に有用である。あるいは、対象のモノクローナル抗体をコードする遺伝子を、例えば当技術分野で知られるPCR技術によってハイブリドーマから単離し、さらにクローニングし適切なベクターで発現させることができる。

また、非ヒト可変領域がヒト定常領域と結合または融合されているキメラ抗体（例えば以下を参照されたい：Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439(1987)）も有用であり得る。

【0028】

抗体は、例えばヒト化により、改変して個体での免疫原性を減少させることができる（例えば以下を参照されたい：Jones et al., Nature, 321: 522(1986); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534(1988); Kabat et al., J. Immunol., 147: 1709(1991); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029(1989); Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 34181(1991); Hodgson et al., Bio/Technology 9: 421(1991)）。本明細書で用いられる“ヒト化抗体”という用語は、非ヒトドナー抗体の重鎖および/または軽鎖の可変ドメイン中のCDRアミノ酸および選択した他のアミノ酸がヒト抗体の等価なアミノ酸に代えて置換されている抗体分子を指す。したがって、ヒト化抗体はヒトの抗体とよく似ているが、ドナー抗体の結合能力を有する。

また別の選択肢では、前記抗体が、2つの異なる抗原結合ドメインを有し、その各ドメインは異なるエピトープに向けられている“二重特異性”抗体であってもよい。

ファージディスプレイ技術を用いて、本発明のポリペプチドに対する結合活性を有する抗体をコードしている遺伝子を、関連する抗体の保有についてスクリーニングされたヒト由来のリンパ球のPCR増幅V-遺伝子レポーター、または未感作ライブラリーのいずれかから選択することができる（J. McCafferty et al., (1990) Nature 348: 552 - 554; J. Marks et al., (1992) Biotechnology 10: 779 - 783）。前記抗体の親和性は、鎖のシャッフリングによって改善することもできる（T. Clackson et al., (1991) Nature 352: 624 - 628）。

上記の技術によって作製された抗体は、ポリクローナルであれモノクローナルであれ、免疫アッセイ、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）で試薬として用いることができるという点で、更なる有用性を有する。これらの用途では、これら抗体を、分析的に検出可能な試薬（例えば放射性同位元素、蛍光分子または酵素）で標識することができる。

【0029】

本発明の第二および第三の特徴の好ましい核酸分子は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：6、配列番号：8および配列番号：14に記載のポリペプチド配列をコードするものである。これら核酸分子は、本明細書に記載した方法および用例で用いることができる。本発明の核酸分子は、好ましくは本明細書に開示される配列に由来する少なくともn個の連続するヌクレオチドを含み、この場合、前記個々の配列に応じてnは10またはそれより大きい（例えば12、14、15、18、20、25、30、35、40またはそれより大きい）。

本発明の核酸分子は、上記で述べた核酸分子に相補的な配列も含む（例えばアンチセンスまたはプローブとしての目的のために）。

本発明の核酸分子は、RNA（例えばmRNA）、またはDNA（例えばcDNA、合成DNAまたはゲノムDNAを含む）の形態であってもよい。そのような核酸分子は、クローニングによって、化学合成によって、またはそれらの組み合わせによって得ることができる。前記核酸分子は、固相ホスホルアミダイト化学合成のような技術を用いる化学合成によって、ゲノムまたはcDNAライブラリーから、または生物体からの分離によって調製することができる。RNA分子は、一般的にはDNA配列のin vitroまたはin vivo転写によって作製され得る。

核酸分子は、二本鎖でも一本鎖でもよい。一本鎖DNAは、コード鎖（センス鎖としても知られる）でも、非コード鎖（アンチセンス鎖とも称される）でもよい。

“核酸分子”という用語には、DNAおよびRNAのアナログ（例えば改変骨格を含むもの）、並びにペプチド核酸（PNA）も含まれる。本明細書で用いられる“PNA”という用語は、

10

20

30

40

50

アンチセンス分子または抗遺伝子(anti-gene)作用因子を指し、長さが少なくとも5ヌクレオチドであってアミノ酸残基のペプチド骨格に結合されたオリゴヌクレオチドを含む。前記ペプチド骨格は好ましくはリジンで終わり、前記末端リジンは当該組成物に可溶性を付与する。PNAは、PEG化(pegylated)されて細胞内での寿命が延長されてもよい{細胞内では、PNAは優先的に相補性一本鎖DNAおよびRNAと結合して転写物の伸長を停止させる(P.E. Nielsen et al. (1993) Anticancer Drug Des. 8: 53 - 63)}。

【0030】

配列番号：2のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：12に記載するように、配列番号：1に示す核酸分子のコード配列(ヌクレオチド152 - 475)と同一であり得る。配列番号：7のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：10に記載するように、配列番号：1に示す核酸分子のコード配列(ヌクレオチド218 - 475)と同一であり得る。配列番号：4のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：3に示す核酸分子のコード配列と同一であり得る。配列番号：6のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：11に記載するように、配列番号：5に示す核酸分子のコード配列(ヌクレオチド152 - 721)と同一であり得る。配列番号：8のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：9に記載するように、配列番号：5に示した核酸分子のコード配列(ヌクレオチド218 - 721)と同一であり得る。配列番号：14のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：15に記載するように、配列番号：13に示す核酸分子のコード配列(ヌクレオチド69 - 719)と同一であり得る。

10

【0031】

これらの分子はまた、遺伝コードの縮退の結果として、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：14をコードする配列と異なる配列を有することもある。配列番号：2、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：14をコードするそのような核酸分子には、それ自体で成熟なポリペプチドのコード配列；成熟ポリペプチドのコード配列および付加コード配列(例えばリーダー配列または分泌配列をコードするもの)、例えばプロ-、プレ-またはプレプロ-ポリペプチド配列をコードするもの；前述の付加的コード配列を伴って、または伴わないで、さらに付加的な非コード配列(非コード5'および3'配列を含む)を伴う成熟ポリペプチドのコード配列が含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記の非コード5'および3'配列は、例えば転写される非翻訳配列で、転写(終止シグナルを含む)、リボソーム結合およびmRNA安定性において役割を果たすものである。前記核酸分子は、更なる機能性を提供するアミノ酸のような付加アミノ酸をコードする付加配列を含むこともできる。

20

30

【0032】

本発明の第二および第三の特徴の核酸分子は、本発明の第一の特徴のポリペプチドおよびフラグメントの機能的等価物およびそれらのフラグメントもコードし得る。そのような核酸分子は、天然に存在する変種(例えば天然に存在する対立形質変種)であっても、または前記分子は天然に存在することが知られていない変種であってもよい。前記のような天然に存在しない核酸分子の変種は、突然変異誘発技術(核酸分子、細胞または生物に対して適用される技術が含まれる)によって達成できる。

40

このような変種の中では、特にヌクレオチドの置換、欠失または挿入によって前述の核酸分子と異なる変種が挙げられる。置換、欠失または挿入には、1つまたは2つ以上のヌクレオチドが関与し得る。変種は、コード領域または非コード領域またはその両方において変化していてもよい。コード領域における変化は、保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失または挿入を生成し得る。

本発明の核酸分子はまた、多様な理由で、当技術分野で一般的に知られている方法を用いて操作されてもよく、前記方法としては、遺伝子産物(ポリペプチド)のクローニング、プロセッシングおよび/または発現の改変が挙げられる。ランダムフラグメント化によるDNAシャッフリングならびに遺伝子フラグメントおよび合成オリゴヌクレオチドのPCRリアッセムブリは、ヌクレオチド配列の操作に用いられ得る技術に含まれる。部位特異的

50

突然変異誘発を用いて、新規な制限部位の挿入、グリコシル化パターンの変更、コドンの優先性の変化、スプライシング変種の生成、変異の導入などを行うことができる。

本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする核酸分子は、結合核酸分子が融合タンパク質をコードするように、異種配列に連結されてもよい。前記のような結合核酸分子は本発明の第二または第三の特徴に包含される。例えば、本発明のポリペプチドの活性の阻害物質についてペプチドライブラリーをスクリーニングするために、前記のような結合核酸分子を用いて、市販の抗体により認識され得る融合タンパク質を発現させることは、有用であり得る。融合タンパク質はまた、本発明のポリペプチド配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように操作し、それによって前記ポリペプチドを異種タンパク質から切り離して精製することができるようにしてもよい。

10

本発明の核酸分子には、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、したがってそのコード核酸分子とハイブリダイズする（ハイブリダイゼーション）アンチセンス分子も含まれる。そ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、当業者にはよく知られるように、本発明のポリペプチドをコードする標的核酸を認識し、その標的核酸と特異的に結合してその転写を妨げるようにデザインすることができる（例えば以下の文献を参照されたい：J.S. Cohen, Trends in Pharm. Sci., 10: 435 (1989); J. Okano, Neurochem. 56: 560(1991); J. O' Connor, Neurochem. 56: 560(1991); Lee et al., Nucleic Acids Res. 6: 3073(1979); Cooney et al., Science 241: 456(1988); Dervan et al., Science 251: 1360(1991)）。

20

【0033】

本明細書で用いられる“ハイブリダイゼーション”という用語は、2つの核酸分子が水素結合によって互いに会合することを指す。典型的には、1つの分子が固相支持体に固定され、他方は溶液中で遊離しているであろう。次に、2つの分子は、水素結合に適した条件下で互いに接触させられ得る。前記結合に影響する因子には以下が含まれる：溶媒の種類および体積；反応温度；ハイブリダイゼーションの時間；攪拌；液相分子の固相支持体への非特異的結合を妨害する薬剤（デンハルト試薬、またはBLOTTO）；分子の濃度；分子の結合速度を増加させる化合物の使用（硫酸デキストランまたはポリエチレングリコール）；およびハイブリダイゼーションに続く洗滌条件のストリンジェンシー（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。

完全に相補的な分子と標的分子とのハイブリダイゼーションの阻害は、当業者に知られるハイブリダイゼーションアッセイを用いて調べることができる（例えばSambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。したがって、実質的に相同な分子は、文献（G.M. Wahl and S.L. Berger, 1987, Methods Enzymol. 152: 399 - 407; A.R. Kimmel, 1987, Methods Enzymol. 152: 507 - 511）で教示されるように、完全に相同な分子と標的分子との結合を種々のストリンジェンシー条件下で競合させ阻害するであろう。

30

“ストリンジェンシー”とは、異なる分子の会合よりも非常に類似した分子の会合に適したハイブリダイゼーション反応の条件を指す。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、以下を含む溶液（50%のホルムアミド、5倍のSSC（150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5倍のデンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、および20 μ g/mLの変性せん断サケ精子DNA）中で42 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベーションし、続いてフィルターを約65 $^{\circ}$ Cにて0.1倍のSSC中で洗滌すると定義される。低ストリンジェンシー条件は、35 $^{\circ}$ Cにて実施されるハイブリダイゼーション反応を含む（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。好ましくは、ハイブリダイゼーションに用いられる条件が高ストリンジェンシー条件である。

40

【0034】

本発明のこの特徴の好ましい態様は、INSP002ポリペプチド（配列番号：2、配列番号：4、配列番号：7、配列番号：6、配列番号：8および配列番号：14）をコードする核酸分子の全長にわたって少なくとも70%同一である核酸分子、およびそのような核酸分子と実質的に相補的な核酸分子である。好ましくは、本発明のこの特徴の核酸分子は、配列番号：1、配列番号：10および配列番号：12で与えられている配列番号：2および配列番号：7の

50

コード配列；配列番号：3で与えられている配列番号：4のコード配列；配列番号5、配列番号：9および配列番号：11で与えられている配列番号：6および配列番号：8のコード配列；または配列番号：13および配列番号：15で与えられている配列番号：14のコード配列；の全長にわたって少なくとも80%同一またはそれらに対して相補的な核酸分子である領域を含む。これに関しては、そのような核酸分子の全長にわたって少なくとも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%または99%同一の核酸分子が特に好ましい。この特徴の好ましい態様は、INSP002ポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を実質的に保持するポリペプチドをコードする核酸分子である。

【0035】

本発明はまた、以下の工程を含む、本発明の核酸分子を検出する方法を提供する：(a) 二重鎖を形成するハイブリダイゼーション条件下で、本発明の核酸プローブを生物学的サンプルと接触させる工程；および(b) 形成された前記の二重鎖を全て検出する工程。

本発明に従って利用し得るアッセイに関連して下記でさらに考察するように、上述の核酸分子をRNA、cDNAまたはゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとして用いて、INSP035ポリペプチドをコードする完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離し、さらにINSP035ポリペプチドをコードする遺伝子と高い配列類似性を有する相同遺伝子またはオーソログ遺伝子のcDNAまたはゲノムクローンを単離することができる。

これに関しては、当技術分野で既知の他の技術のうち、特に以下の技術を利用することができる。これらの技術は、例示として下記で考察される。DNAのシーケンシングおよび解析の方法は周知であって、当技術分野では一般的に利用可能であり、本明細書で考察される本発明の態様の多くを実施するために実際に用いることができる。そのような方法では、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、シークエナーゼ(US Biochemical Corp., Cleaveland, OH)、Taqポリメラーゼ(Perkin Elmer)、耐熱性T7ポリメラーゼ(Amersham, Chicago, IL)、またはポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼの組合せ(例えば市販(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)のELONGASE増幅システムで見出されるようなもの)のような酵素を利用することができる。好ましくは、シーケンシング過程は、例えばハミルトンマイクロラボ(Hamilton Micro Lab) 2200(Hamilton, Reno, NV)、ペルティエサーマルサイクラー(Peltier Thermal Cycler) PTC200(MJ Research, Watertown, MA)、ABIカタリスト並びに373および377DNAシークエンサー(Perkin Elmer)のような機器を用いて自動化することができる。

【0036】

INSP002ポリペプチドの機能と等価な機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法の1つは、当技術分野で知られている標準的な手法を用い、天然のプローブまたは人工的に設計したプローブによりゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーを探索することである(例えば以下の文献を参照されたい：“Current Protocols in Molecular Biology”, Ausubel et al.(eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992)。特に有用なプローブは、適切なコード遺伝子(配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：15)に由来する核酸配列に一致するか、または前記配列と相補的であって、少なくとも15、好ましくは少なくとも30、さらに好ましくは少なくとも50の連続する塩基を含むプローブである。前記のようなプローブは、分析的に検出可能な試薬で標識して、前記プローブの識別を容易にすることができる。有用な試薬には、放射性同位元素、蛍光色素、および検出可能な生成物の形成を触媒し得る酵素が含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらのプローブを用いて、当業者は、ヒト、哺乳類または他の動物供給源から対象のタンパク質をコードするゲノムDNA、cDNAまたはRNAポリヌクレオチドの相補的なコピーを単離し、近縁配列、例えば前記のファミリー、タイプおよび/またはサブタイプに属するまた別のメンバーについて、前記の供給源をスクリーニングすることができるであろう。

【0037】

多くの場合、単離されるcDNA配列は不完全で、ポリペプチドをコードする領域は短く(

10

20

30

40

50

通常は5'末端で)切断されているであろう。完全長cDNAを得るために、または短いcDNAを伸長させるために、いくつかの方法が利用可能である。そのような配列は、部分的なヌクレオチド配列を用い、上流の配列(例えばプロモーターおよび調節エレメント)を検出するための当技術分野で公知の種々の方法を用いて伸長させることができる。例えば、使用され得るある方法は、cDNA末端迅速増幅法(RACE;例えば以下を参照されたい:Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988) 85: 8998 - 9002)に基づく。前記技術の最近の改変(例えばマラソン(Marathon)(商標)技術(Clontech Laboratories Inc.)により例示される)は、より長いcDNAの検索を顕著に単純化している。“制限部位”PCRと称されるわずかに異なる技術では、普遍的プライマーを用いて、既知の遺伝子座に近接する未知の核酸配列が検索される(G. Sarkar (1993) PCR Methods Applic. 2: 318 - 322)。逆PCRも、既知の領域に基づく多様なプライマーを用いて、配列を増幅することまたは伸長することに用いられ得る(T. Triglia et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 81 86)。使用され得る別の方法は捕捉PCRで、この方法は、ヒトおよび酵母の人工染色体DNAにおける既知配列に近接しているDNAフラグメントのPCR増幅を含む(M. Lagerstrom et al. (1991) PCR Methods Applic. 1: 111 - 119)。未知配列を検索するために用いられ得る別の方法は、パーカーの方法である(J.D. Parker et al.(1991) Nucleic Acids Res. 19: 3055 - 3060)。さらに、ゲノムDNAを少しずつ移動して調べるためにPCR、入れ子(nested)プライマーおよびプロモーターファインダー™(PromoterFinder™)ライブラリー(Clontech, Palo Alto, CA)を用いてもよい。この方法ではライブラリーのスクリーニングが不要で、イントロン/エクソン結合部の発見に有用である。

【0038】

完全長cDNAをスクリーニングする場合、より大きなcDNAを包含するようにサイズ選択されたライブラリーを用いることが好ましい。さらにまた、遺伝子の5'領域を含む配列をより多く含むという点で、ランダムプライミングした(random-primed)ライブラリーが好ましい。ランダムプライムライブラリーの使用は、オリゴd(T)ライブラリーが完全長cDNAを生成できない状況で特に好まれ得る。ゲノムライブラリーは、5'非転写調節領域に配列を伸長させるために有用であり得る。

本発明のある態様では、染色体上の位置特定のために、本発明の核酸分子を用いることができる。この技術では、核酸分子は個々のヒト染色体上の特定の位置に対して特異的に標的化され、個々のヒト染色体上の特定の位置とハイブリダイズさせることができる。本発明の関連配列の染色体上へのマッピングは、遺伝子関連疾患に関する配列の相関性確認において重要な工程である。いったん染色体の正確な位置に配列がマッピングされたら、前記配列の染色体上の物理的な位置を遺伝子地図データと相関させることができる。そのようなデータは、例えば以下で見出すことができる: V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man(ジョーンズホプキンス大学、ウェルチ医学図書館を通じてオンラインで利用可能である)。同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との関係を、次に連鎖解析(物理的に近接する遺伝子の同時遺伝(coinheritance))によって同定する。これにより、ポジショナルクローニングまたは他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を検索する研究者に貴重な情報が提供される。いったん疾患または症候群の位置が遺伝連鎖によって特定のゲノム領域で大まかに限局されたら、前記領域にマッピングされるいずれの配列も、更なる解析のための関連遺伝子または調節遺伝子となることができる。前記核酸分子はまた、正常な個体、キャリア個体または罹患個体間で転座、逆位などによる染色体位置上の相違を検出するために用いることができる。

【0039】

本発明の核酸分子はまた、組織分布同定(tissue localisation)のために貴重である。そのような技術は、ポリペプチドをコードするmRNAの検出によって、組織中の前記ポリペプチドの発現パターンの決定を可能にする。これらの技術には、in situハイブリダイゼーション技術およびヌクレオチド増幅技術(例えばPCR)が含まれる。これらの研究から得られる結果は、生物内での前記ポリペプチドの正常な機能を示唆する。さらに、変異遺伝子によってコードされるmRNAの発現パターンと正常mRNA発現パターンとの比較研究によ

って、変異ポリペプチドの疾患における役割に対する貴重な洞察が提供される。そのような不適切な発現は時間的、位置的または量的性質を有する場合もある。

遺伝子サイレンシングアプローチを実施して、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の内在性発現をダウンレギュレートすることもできる。RNA干渉 (RNAi) (S.M. Elbashir et al. Nature 2001, 411, 494-498) は、使用可能な配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのための1つの方法である。短いdsRNAオリゴヌクレオチドをin vitroで合成して細胞内に導入する。これらdsRNAの配列特異的結合によって標的mRNAの分解が開始され、標的タンパク質の発現が減少または阻害される。

上記に述べた遺伝子サイレンシングの有効性は、ポリペプチド発現の測定 (例えばウェスタンブロットングによる)、またはTaqManによる方法を用いるRNAレベルの測定によって評価することができる。

10

【0040】

本発明のベクターは本発明の核酸分子を含み、クローニングベクターでも発現ベクターでもよい。本発明のベクターで形質転換、トランスフェクトまたは形質導入され得る本発明の宿主細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよい。

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前記ポリペプチドをコードする核酸分子の発現によって、リコンビナント形態で調製することができる。前記のような発現方法は当業者によく知られており、多くは以下の文献でより詳細に記述されている: Sambrook et al. (上掲書) および Fernandez & Hoeffler (1998, eds. "Gene expression systems. Using nature for the art of expression", Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto)。

20

【0041】

一般的には、要求される宿主でポリペプチドを生成させるために、核酸分子の維持、増殖または発現に適したいずれの系またはベクターも用いることができる。周知であり日常的である種々の技術のいずれによっても (例えば前掲書 (Sambrook et al.) に記載されたようなもの)、適切なヌクレオチド配列を発現系に挿入することができる。一般的には、コード遺伝子は制御エレメント (例えばプロモーター、リボソーム結合部位 (細菌での発現の場合)、および場合によってオペレーター) の制御下に置かれ、それによって所望のポリペプチドをコードするDNA配列を形質転換宿主細胞でRNAに転写させることができる。

30

適切な発現系の例には、例えば染色体系、エピソーム系およびウイルス由来系、例えば以下に由来するベクターが含まれる: 細菌プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パポバウイルス (例えばSV40)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス、または上記の組合せ、例えばプラスミドとバクテリオファージの遺伝子エレメントに由来するもの (例えばコスミドおよびファージミドを含む)。ヒト人工染色体 (HAC) もまた、プラスミドに包含させ発現させるよりも大きいDNAフラグメントを搬送するのに用いることができる。

【0042】

特に適切な発現系には、リコンビナントバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された微生物 (例えば細菌); 酵母発現ベクターで形質転換された酵母; ウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) を感染させた昆虫細胞系; ウイルス発現ベクター (例えばカリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV) または細菌発現ベクター (例えばTiまたはpBR322プラスミド) で形質転換した植物細胞系; または動物細胞系が含まれる。無細胞翻訳系もまた、本発明のポリペプチドの生成に用いることができる。

40

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 et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) および上掲書 (Sambrook et al.)) に記載された方法によって達成できる。特に適切な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン仲介トランスフェ

50

クション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、陽イオン脂質仲介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、擦過ローディング(scrape loading)、弾道導入または感染が含まれる(以下を参照されたい: Sambrook et al. (1989) 上掲書; Ausubel et al. (1991) 上掲書; Spector, Goldman & Lewinwald, (1998))。真核細胞では、発現系は、その系の要求に応じて一過性(例えば、エピソード性)または永続的(染色体組込み)であり得る。

【0043】

コード核酸分子は、所望であれば、例えば翻訳ポリペプチドの小胞体内腔、細胞膜周辺腔または細胞外環境への分泌のために、シグナルペプチドまたはリーダー配列のような制御配列をコードする配列を含んでいても、または含んでいなくてもよい。これらのシグナルは前記ポリペプチドにとって内因性であってもよく、または異種シグナルであってもよい。リーダー配列は、翻訳後プロセッシングで細菌宿主によって取り除くことができる。

コントロール配列の他に、宿主細胞の増殖に関連して前記ポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することが望ましい場合がある。調節配列の例は、化学的または物理的刺激(調節化合物の存在を含む)または多様な温度もしくは代謝条件にตอบสนองして遺伝子の発現を増加させたり低下させたりする配列である。調節配列は、ベクターの非翻訳領域、例えばエンハンサー、プロモーター並びに5'および3'非翻訳領域である。これらは、宿主細胞タンパク質と相互作用して、転写および翻訳を実行する。そのような調節配列は、その強度および特異性を変化させることができる。利用されるベクター系および宿主に依存して、多くの適切な転写および翻訳エレメント(構成性および誘発性プロモーターを含む)を用いることができる。例えば、細菌系でクローニングするときは、誘発性プロモーター、例えばBluescriptファージミド(Stratagene, La Jolla, CA)またはpSport1(商標)プラスミド(Gibco BRL)などのハイブリッドlacZプロモーターを用いることができる。バキュロウイルスポリヘドリン(polyhedrin)プロモーターは、昆虫細胞で用いることができる。植物細胞ゲノムに由来するプロモーターまたはエンハンサー(例えば熱ショック、RUBISCOおよび貯蔵タンパク質遺伝子)または植物ウイルスに由来するプロモーターまたはエンハンサー(例えばウイルスプロモーターまたはリーダー配列)は、ベクターへクローニングすることができる。哺乳類細胞系では、哺乳類遺伝子由来または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが好ましい。配列の多数コピーを含む細胞株の作製が必要な場合、SV40またはEBVをベースとするベクターが、適切な選択マーカーとともに用

10

20

30

【0044】

発現ベクターは、特定の核酸コード配列を適切な調節配列とともにベクター内に配置させることができるように構築される。前記コード配列の調節配列に関する位置および向きは、前記コード配列が調節配列の“制御”下で転写されるような位置および向きである(すなわちコントロール配列にてDNA分子と結合するRNAポリメラーゼは、前記コード配列を転写する)。いくつかの事例では、前記配列を適切な向きで制御配列に付属させることができるように(すなわちリーディングフレームを維持するために)、前記配列を改変する必要があるであろう。

コントロール配列および他の調節配列は、ベクターへの挿入の前に核酸コード配列に連結させることができる。あるいは、コントロール配列および適切な制限部位を既に含む発現ベクターへ、コード配列を直接クローニングすることができる。

リコンビナントポリペプチドの長期的かつ高収量の生成のためには、安定な発現が好ましい。例えば、対象のポリペプチドを安定に発現する細胞株は、ウイルスの複製起点および/または内因性発現エレメント並びに選択マーカー遺伝子を同じまたは別個のベクター上に含む発現ベクターを用いて形質転換させることができる。ベクターの導入に続き、選択培地に切り替える前に細胞を栄養(enriched)培地で1-2日間増殖させることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することで、選択マーカーの存在によって、導入された配列をうまく発現する細胞の増殖および回収が可能になる。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、細胞の種類に適した組織培養技術を用いて増殖させる

40

50

ことができる。

【0045】

発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞株は当技術分野で公知であり、米国菌培養収集所 (American Type Culture Collection, ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。そのような細胞株には、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa細胞、ベイビーハムスター腎 (BHK) 細胞、サル腎 (COS) 細胞、C127細胞、3T3細胞、BHK細胞、HEK293細胞、ボウズ (Bowes) メラノーマ細胞およびヒト肝細胞癌 (例えばHepG2) 細胞および他の多数の細胞株が挙げられるが、これだけに限られない。

バキュロウイルス系では、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料は、特にインビトロジェン (Invitrogen, San Diego, CA) からキットの形態で (“MaxBac” キット) 商業的に入手可能である。そのような技術は一般的に当業者に知られており、文献には完全に記載されている (Summers & Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555(1987))。この系での使用に特に適切な宿主細胞には、昆虫細胞、例えばドロソフィラ (*Drosophila*) S2細胞およびスピロプテラ (*Spodoptera*) Sf9細胞が含まれる。

当技術分野で公知である多くの植物細胞培養および植物体 (whole plant) 遺伝子発現系が存在する。適切な植物細胞遺伝子発現系の例には、米国特許第5,693,506号、5,659,122号および5,608,143号に記載されるものが含まれる。植物細胞培養における遺伝子発現の更なる例は、文献に記載されている (Zenk (1991) *Phytochemistry* 30: 3861 - 3863)。

特に、プロトプラストを単離し、これを培養して完全な再生植物を形成することが可能な植物は全て利用することができ、それによって移入遺伝子を含む完全な植物が回収できる。特に、サトウキビ、サトウダイコン、綿花、果実および他の樹木、マメ類および野菜の主要な種の全てを含む (ただしこれらに限定されない) 全ての植物は、培養細胞または培養組織から再生させることができる。

【0046】

特に好ましい細菌宿主細胞の例には、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌 (*E. coli*)、ストレプトマイセスおよびバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 細胞が含まれる。

真菌での発現に特に適切な宿主細胞の例には、酵母細胞 (例えば*S. cerevisiae*) およびアスペルギルス細胞が含まれる。

形質転換細胞株の回収に用いることができる多くの選択系は、当技術分野で公知である。そのような例としては、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (*M. Wigler et al.* (1977) *Cell* 11: 223 - 32) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (*I. Lowy et al.* (1980) *Cell* 22: 817 - 23) の遺伝子が挙げられ、これらはそれぞれ tk- または aprt⁺ 細胞で用いることができる。

さらにまた、抗代謝物質耐性、抗生物質耐性または除草剤耐性を選択基準として用いてもよい。例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) はメトトレキセートに対する耐性を付与し (*M. Wigler et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 3567 - 70)、nptはアミノグリコシド系ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を付与し (*F. Colbere-Garapin et al.* (1981) *J. Mol. Biol.* 150: 1 - 14)、さらにalsまたはpatはそれぞれクロロスルフロン (*chlorsulfuron*) およびホスフィントリシン (*phosphinotricin*) アセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する。さらに別の選択可能な遺伝子が報告されており、それらの例は当業者には明白であろう。

【0047】

マーカー遺伝子の発現の有無は対象の遺伝子も存在することを示唆するが、対象の遺伝子の存在および発現を確認する必要がある。例えば、関連配列がマーカー遺伝子配列内に挿入されている場合、マーカー遺伝子機能が存在しないことによって、適切な配列を含む形質転換細胞を識別することができる。あるいは、マーカー遺伝子は、ただ1つのプロモーターの制御下に、本発明のポリペプチドをコードする配列とともに直列に配置することができる。通常、誘発または選択に応答するマーカー遺伝子の発現は、直列遺伝子の発現も示している。

あるいは、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含み、前記ポリペプチドを発

10

20

30

40

50

現する宿主細胞は、当業者に知られている多様な手法で同定することができる。前記手法には、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質バイオアッセイ、例えば蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) またはイムノアッセイ技術 (例えば酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) および放射性イムノアッセイ (RIA)) が含まれ (ただしこれらに限定されない)、核酸またはタンパク質の検出および/または定量的のためにメンブレン、溶液またはチップをベースとする技術が含まれる (例えば以下を参照されたい: R. Hampton et al. (1990) Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN; および D.E. Maddox et al. (1983) J. Exp. Med. 158: 1211-1216)。

【0048】

多様な標識および結合技術が当業者に知られており、種々の核酸およびアミノ酸アッセイで用いることができる。本発明のポリペプチドをコードする核酸分子に近縁な配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプローブの作製手段には、標識したポリヌクレオチドを用いるオリゴ標識、ニックトランスレーション、末端標識またはPCR増幅が含まれる。あるいは、本発明のポリペプチドをコードする配列をベクターにクローニングしてmRNAプローブを作製することができる。そのようなベクターは当技術分野で公知であって、商業的に入手可能であり、適切なRNAポリメラーゼ (例えばT7、T3またはSP6) および標識ヌクレオチドを添加することにより *in vitro* でRNAプローブを合成することに用いられ得る。これらの手法は、商業的に入手可能な種々のキット (Pharmacia & Upjohn (Kalamazoo, MI); Promega (Madison, WI); U.S. Biochemical Corp., (Cleveland, OH)) を用いて実施することができる。

検出を容易にするために用いられ得る適切なレポーター分子または標識には、放射性核種、酵素および蛍光、化学発光または色素生産性物質、基質、コファクター、阻害剤、磁性粒子などが挙げられる。

【0049】

本発明の核酸分子は、トランスジェニック動物 (特にげっ歯類動物) の作製にも用いることができる。そのようなトランスジェニック動物は、本発明の別の特徴を構成する。そのような作製は、体細胞の改変によって局部的に、または遺伝性改変を導入する生殖細胞系列療法によって実施することができる。前記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ーとして有効な薬剤分子のための動物モデルを作製するために特に有用であり得る。

ポリペプチドは、周知の方法によってリコンビナント細胞培養物から回収し精製することができる。前記周知の方法には、硫酸またはエタノール沈澱、酸性抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、リン酸化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、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーが含まれる。高性能液体クロマトグラフィーは、精製に特に有用である。単離および精製の間ポリペプチドが変性した場合には、タンパク質のリフォールディングのためによく知られている技術を用いて活性な高次構造を再生することができる。

【0050】

所望の場合には、可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に本発明のポリペプチドをコードする配列を連結させることにより特殊化したベクター構築物も、タンパク質の精製を容易にするために用いることができる。そのような精製促進ドメインの例には、金属キレートペプチド (例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-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にするプロテインAドメイン、およびFLAGS伸長/アフィニティー精製システム (Immunex Corp., Seattle, WA) で用いられるドメイン) が含まれる。切断可能なリンカー配列 (例えばXA因子またはエンテロキナーゼ (Invitrogen, San Diego, CA) に特異的なもの) を精製ドメインと本発明のポリペプチドとの間に包含させて、精製を容易にすることに用いてもよい。そのような発現ベクターの1つは、チオレドキシニンまたはエンテロキナーゼ切断部位に先行するいくつかのヒスチジン残基と融合させた本発明のポリペ

10

20

30

40

50

プチドを含む融合タンパク質の発現を提供する。ヒスチジン残基は、IMAC(固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー; J. Porath et al.(1992) Prot. Exp. Purif. 3: 263 - 281)により精製を容易にし、一方、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ切断部位は、融合タンパク質からポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターについての考察は以下で提供される: D.J. Kroll et al.(1993) DNA Cell Biol. 12: 441 - 453)。

【0051】

スクリーニングアッセイで使用するためにポリペプチドを発現させる場合は、前記ポリペプチドを発現する宿主細胞の表面で前記ポリペプチドを生成させることが一般には好ましい。この場合、宿主細胞はスクリーニングアッセイで使用する前に、例えば蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)またはイムノアフィニティー技術のような技術を用いて収穫することができる。ポリペプチドが培養液中に分泌される場合は、前記培養液を回収して発現されたポリペプチドを回収および精製することができる。ポリペプチドが細胞内で生成される場合、ポリペプチドを回収する前に、先ず初めに細胞を溶解させねばならない。

10

本発明のポリペプチドを用いて、種々の薬剤スクリーニング技術のいずれかで化合物ライブラリーをスクリーニングすることができる。そのような化合物は、本発明のポリペプチドの遺伝子発現レベルまたは活性レベルを活性化させる(アゴニスト作用)か、または阻害する(アンタゴニスト作用)ことができ、本発明のさらなる特徴を形成し得る。好ましい化合物は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現を変化させることに有効であるか、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性を調節することに有効である。

20

アゴニスト化合物またはアンタゴニスト化合物は、例えば細胞、無細胞調製物、化学物質ライブラリーまたは天然物混合物から単離することができる。これらのアゴニストまたはアンタゴニストは、天然または改変された基質、リガンド、酵素、レセプター、もしくは構造的もしくは機能的模倣物質であってもよい。前記のようなスクリーニング技術の適切な概論については、以下を参照されたい: Coligan et al.(1991) Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5。

【0052】

良好なアンタゴニストである可能性が高い化合物は、本発明のポリペプチドと結合し、結合しているときに前記ポリペプチドの生物学的作用を誘発しない分子である。強力なアンタゴニストには、本発明のポリペプチドと結合し、それによって本発明のポリペプチドの活性を阻害または消滅させる小型有機分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。そのようなやり方で、前記ポリペプチドと正常な細胞の結合分子との結合が阻害され、その結果前記ポリペプチドの正常な生物学活性が阻害され得る。

30

このようなスクリーニング技術で用いられる本発明のポリペプチドは、溶液中で遊離していても、固相支持体に固定されていても、細胞表面に保持されていても、または細胞内に位置していてもよい。一般に、このようなスクリーニングの方法は、前記のポリペプチドを発現している適切な細胞または細胞膜を用いることを含み、前記細胞または細胞膜をテスト化合物と接触させて、結合または機能的応答の刺激もしくは阻害を観察する。続いて前記テスト化合物と接触させた細胞の機能的応答を、前記テスト化合物と接触させなかったコントロール細胞と比較する。このようなアッセイによって、前記ポリペプチドの活性化によって生じるシグナルをテスト化合物がもたらすか否かを、適切な検出系を用いて評価することができる。活性化の阻害剤は、一般的には既知のアゴニストの存在下でアッセイを行われ、テスト化合物の存在下でのアゴニストによる活性化の影響が観察される。

40

【0053】

本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト化合物を同定する好ましい方法は、以下の工程を含む:

(a) 本発明の第一の特徴のポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合に応答して検出可能なシグナルを提供する

50

ことができる第二の成分と結合されており；さらに

(b) 前記化合物と前記ポリペプチドとの相互作用によって生じるシグナルのレベルを測定することにより、前記化合物が前記ポリペプチドと結合しこれを活性化するかまたは阻害するかを決定する工程。

【0054】

本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定するさらに好ましい方法は、以下の工程を含む：

(a) 前記ポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合に应答して検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合されており；さらに

(b) 前記化合物と前記ポリペプチドとの相互作用によって生じるシグナルレベルを前記化合物が存在しないときのシグナルレベルと比較することにより、前記化合物が前記ポリペプチドと結合しこれを活性化するかまたは抑制するかを決定する工程。

さらに好ましい態様では、上述の一般的な方法が、前記ポリペプチドに対する標識または非標識リガンドの存在下でアゴニストまたはアンタゴニストの同定を行う工程をさらに含み得る。

【0055】

本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法の別の態様は、以下の工程を含む：

本発明のポリペプチドをその表面に有する細胞とリガンドとの結合または前記のポリペプチドを含む細胞膜とリガンドとの結合の抑制を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で候補化合物を存在させて決定する工程、および前記ポリペプチドに結合したリガンドの量を決定する工程。リガンドの結合の減少をひき起こし得る化合物は、アゴニストまたはアンタゴニストであると考えられる。好ましくは、前記リガンドが標識されている。

より詳しくは、アンタゴニストまたはアゴニスト化合物をポリペプチドについてスクリーニングする方法は以下の工程を含む：

(a) 本発明のポリペプチドをその表面に発現している全細胞または本発明のポリペプチドを含む細胞膜と、標識リガンドとをインキュベートする工程；

(b) 前記全細胞または細胞膜と結合した標識リガンドの量を測定する工程；

(c) 工程(a)の標識リガンドおよび前記全細胞または細胞膜の混合物に候補化合物を添加し、前記混合物を平衡化させる工程；

(d) 前記全細胞または細胞膜と結合した標識リガンドの量を工程(c)の後で測定する工程；さらに

(e) 工程(b)および工程(d)で結合した標識リガンドの相違を比較する工程であって、それにより工程(d)結合の減少をひき起こす化合物はアゴニストまたはアンタゴニストであると考え前記工程。

【0056】

前記ポリペプチドは、上記のアッセイにおいて用量依存的な様式で多様な生理学および病理学的プロセスを調節することが判明するであろう。したがって、本発明の“機能的等価物”には、上記アッセイにおいて用量依存的な様式で同じ調節的活性のいずれかを示すポリペプチドが含まれる。用量依存的活性の程度は本発明のポリペプチドのそれと同一である必要はないが、好ましくは前記“機能的等価物”は、所定の活性アッセイにおいて本発明のポリペプチドと比較して実質的に類似の用量依存性を示すであろう。

上述のある態様では、単純な結合アッセイを用いてもよい。この場合、テスト化合物のポリペプチド保持表面への付着が、直接的または間接的にテスト化合物と結合させた標識手段によって検出されるか、または標識競合物質との競合を含むアッセイで検出される。別の態様では、競合薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この場合、ポリペプチドと特異的に結合することができる中和抗体が、結合についてテスト化合物と競合

10

20

30

40

50

する。このようにして、前記抗体を用いて、前記ポリペプチドに対し特異的な結合親和性を保有する一切のテスト化合物の存在を検出することができる。

【0057】

前記ポリペプチドをコードするmRNAの細胞内産生に対する添加テスト化合物の影響を検出するアッセイをデザインすることもできる。例えば、当技術分野で公知の標準的な方法によりモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いてポリペプチドの分泌レベルまたは細胞結合レベルを測定するELISAを構築することができ、前記ELISAを用いて、適切に操作された細胞または組織からのポリペプチド生成を阻害または増強し得る化合物について検索することができる。続いて、前記ポリペプチドと被検化合物との結合複合体の形成を測定することができる。

10

さらにまた本発明の範囲内に含まれるアッセイ方法は、過剰発現アッセイまたは除去 (ablation) アッセイで本発明の遺伝子およびポリペプチドの使用を必要とするものである。前記のアッセイは、これら遺伝子/ポリペプチドの細胞内レベルの操作およびこの操作事象による前記被操作細胞の生理機能に対する影響の評価を含む。例えばそのような実験によって、特定の遺伝子/ポリペプチドが関与するシグナル伝達経路および代謝経路の詳細が明らかにされ、本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アイデンティティーに関する情報がもたらされ、さらに関連遺伝子およびタンパク質を調節する方法についての手がかりが提供される。

【0058】

使用され得る別の薬剤スクリーニング技術は、対象のポリペプチドに対して適切な結合親和性を有する化合物の高速大量処理スクリーニングを提供する (国際特許出願W084/03564を参照されたい)。前記方法では、多数の異なる小型のテスト化合物が固相支持体上で合成され、次に本発明のポリペプチドと反応させられ洗浄され得る。ポリペプチドを固定する方法の1つは、非中和抗体を使用することである。続いて、当技術分野で周知の方法を用いて、結合ポリペプチドを検出することができる。精製ポリペプチドはまた、前述の薬剤スクリーニング技術で使用するために、プレート上に直接被覆させることができる。

20

当技術分野で公知の標準的なレセプター結合技術により膜結合レセプターまたは可溶性レセプターを同定するのに、本発明のポリペプチドが用いられ得る。前記標準的な技術は、例えばリガンド結合アッセイおよび架橋アッセイであり、そのようなアッセイでは、ポリペプチドが放射性同位体で標識されているか、化学的に改変されているか、またはその検出もしくは精製を容易にするペプチド配列と融合されており、推定上のレセプター供給源 (例えば細胞の組成物、細胞膜、細胞上清、組織抽出物または体液) とインキュベートされる。結合の有効性は、生物物理的技術、例えば表面プラズモン共鳴および分光法を用いて測定することができる。結合アッセイは、レセプターの精製およびクローニングのために用いることができるが、ポリペプチドとそのレセプターとの結合に競合する前記ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためにも用いることができる。スクリーニングアッセイを実施する標準的な方法は、当技術分野ではよく理解されている。

30

【0059】

本発明はまた、上記で述べるアゴニスト、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有用なスクリーニングキットを含む。

40

本発明は、上記アゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質および酵素、並びに上記で述べる方法によって発見され、本発明のポリペプチドの活性または抗原性を調節する他の化合物を含む。

本発明はまた、本発明のポリペプチド、核酸、リガンドまたは化合物を適切な医薬担体と組合せて含む医薬組成物を提供する。これらの組成物は、下記で詳細に説明するように、治療用もしくは診断用試薬として、ワクチンとして、または他の免疫原性組成物として適切であり得る。

本明細書で用いられる専門用語にしたがえば、ポリペプチド、核酸、リガンドまたは化合物 {X} を含む組成物は、組成物中のX+Yの合計の少なくとも85質量%がXである場合に不純物 (本明細書中ではY) を “実質的に含まない”。好ましくは、Xが組成物中のX+Yの

50

合計の少なくとも約90質量%、より好ましくは少なくとも約95質量%、98質量%または99質量%を構成する。

【0060】

本医薬組成物は、好ましくは治療的に有効な量の本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンドまたは化合物を含むべきである。本明細書で用いられる“治療的に有効な量”という用語は、標的疾患または症状を治療、緩和もしくは予防するために、または検出可能な治療効果もしくは予防効果を示すために必要な治療薬剤の量を指す。いずれの化合物についても、治療的に有効な投与量は、最初に細胞培養アッセイ（例えば新生物細胞培養アッセイ）または動物モデル（通常はマウス、ウサギ、イヌまたはブタ）のいずれかで見積もることができる。動物モデルは、適切な濃度範囲および投与経路の決定にも用いることができる。次にそのような情報を用いて、ヒトで有用な投与用量および投与経路を決定することができる。

ヒト対象者に対する正確な有効量は、疾患状態の重篤度、対象者の全身の健康状態、対象者の年齢、体重および性別、食事、投与時間および投与回数、併用薬剤、反応感受性および治療に対する許容性/応答性に依存するであろう。この量は、日常的検査により決定することができる、それは臨床医の判断の範囲内である。一般には、有効用量は、0.01mg/kgから50mg/kg、好ましくは0.05mg/kgから10mg/kgであろう。本組成物は、患者に個別に投与されてもよく、または他の薬剤、医薬品またはホルモンと一緒に投与されてもよい。

【0061】

医薬組成物はまた、治療薬の投与のために医薬的に許容できる担体を含むことができる。そのような担体には、抗体および他のポリペプチド、遺伝子並びに他の治療薬剤（例えばリポソーム）が含まれるが、ただし担体がそれ自体で前記組成物を投与される個体に有害な抗体の産生を誘発せず、かつ不都合な毒性をもたらすことなく投与され得ることを条件とする。適切な担体は、大型でゆっくりと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、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよび不活性ウイルス粒子であり得る。

医薬組成物に、医薬的に許容できる塩、例えば鉍酸塩（塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などのような）；および有機酸の塩（酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などのような）を用いることができる。医薬的に許容できる担体についての綿密な考察は以下のテキストで入手可能である：Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)。

治療用組成物中の医薬的に許容できる担体は、さらに液体、例えば水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノールを含むことができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、pH緩衝物質などのような助剤が、前記組成物中に存在していてもよい。そのような担体は、患者が摂取できるように、前記医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤などとして製剤化することを可能にする。

【0062】

いったん製剤化されたら、本発明の組成物を直接対象者に投与することができる。治療される対象者は動物で、特にヒト対象者が治療され得る。

本発明で用いられる医薬組成物は、多数の経路（経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、硬膜下腔内、心室内、経皮的アプリケーション（例えばW098/20734を参照）、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、腔内または直腸的手段が挙げられるが、ただしこれらに限定されない）によって投与できる。遺伝子銃またはハイポスプレーもまた、本発明の医薬組成物の投与に用いることができる。典型的には、本治療用組成物は、注射用物質（液体溶液または懸濁剤のいずれか）として調製できる。注射に先立ち液体ビヒクルで溶液または懸濁液とするのに適する固体を調製することもできる。

本組成物の直接的デリバリーは一般に、皮下、腹腔内、静脈内または筋肉内に注射することによって達成されるか、または組織の間隙腔に送達されるであろう。前記組成物はまた、病巣に投与してもよい。投薬治療は、単回投与スケジュールでも複数回投与スケジュールでもよい。

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過剰である場合には、いくつかのアプローチが利用可能である。あるアプローチは、医薬的に許容できる担体とともに上記のような阻害化合物（アンタゴニスト）を、前記ポリペプチドの機能を阻害するのに有効な量で対象者に投与することを含む。前記ポリペプチドの機能の阻害は、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、または第二のシグナルを阻害することによって成され、それによって異常な症状が緩和される。好ましくは、前記アンタゴニストが抗体である。最も好ましくは、そのような抗体が、先に記載するような免疫原性を最少にするキメラ抗体および/またはヒト化抗体である。

【0063】

別のアプローチでは、リガンド、基質、酵素、レセプターに対する結合親和性を保持する該ポリペプチドの可溶性を投与することができる。典型的には、前記ポリペプチドは、関連部分を保持するフラグメントの形態で投与することができる。

また別のアプローチでは、前記ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、内部で生成されるまたは別々に投与されるアンチセンス核酸分子（上述のような）の使用といった発現遮断技術を用いて、阻害することができる。遺伝子発現の改変は、ポリペプチドをコードする遺伝子の制御領域、5'領域または調節領域（シグナル配列、プロモーター、エンハンサーおよびイントロン）に対して相補的な配列またはアンチセンス分子（DNA、RNAまたはPNA）をデザインすることによって達成できる。同様に、阻害は“三重らせん”塩基対方法論を用いて達成することができる。三重らせん対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために二重らせんが十分に開く能力を阻害することから有用である。三重らせんDNAを用いる近年の治療上の進歩は、文献に記載されている（J.E. Gee et al.(1994) In: B.E. Huber & B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY）。相補的配列またはアンチセンス分子をデザインし、リボソームに対する結合を妨げて転写を妨害することによってmRNAの翻訳を遮断することもできる。そのようなオリゴヌクレオチドは投与されてもよいし、またin vivoでの発現によりin situで生成させてもよい。

【0064】

さらに、本発明のポリペプチドの発現は、そのコードmRNA配列に特異的なリボザイムを用いることによって妨げることができる。リボザイムは、天然または合成であり得る触媒的活性型のRNAである（例えば以下を参照されたい：N. Usman et al., Curr. Opin. Struct. Biol.(1996) 6(4): 527 - 533）。合成リボザイムをデザインして、選択した位置でmRNAを特異的に切断し、それによってmRNAの機能的ポリペプチドへの翻訳を妨げることができる。リボザイムは、通常RNA分子で見出されるような、天然のリボースリン酸骨格および天然の塩基を用いて合成され得る。或いは、リボザイムは、非天然の骨格（例えば2'-O-メチルRNA）を用いて合成されて、リボヌクレアーゼ分解から保護されてもよく、また改変塩基を含んでいてもよい。

RNA分子は、細胞内安定性および半減期を増加させるように改変されてもよい。可能な改変には、RNA分子の5'および/または3'末端へのフランキング配列の付加、または分子の骨格内でホスホジエステル結合に代わるホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が含まれるが、ただしこれらに限られない。この概念は、PNAの生成にも受け継がれ、内因性エンドヌクレアーゼによって同様に容易には認識されないイノシン、ケオシン(guosine)およびブトシン(butosine)のような非慣用塩基、ならびにアセチル-、メチル-、チオ-および同様な改変形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンの包含によってPNA分子の全てに広げられ得る。

【0065】

本発明のポリペプチドおよびその活性の過小発現に関連する異常な状態を治療するためには、いくつかのアプローチも利用可能である。あるアプローチは、前記ポリペプチドを活性化する化合物（すなわち上記で述べたアゴニスト）の治療的に有効な量を対象者に投与し、異常な状態を緩和することを含む。あるいは、本ポリペプチドの治療量を適切な医薬担体と組合せて投与し、関連性のあるポリペプチド生理学的バランスを回復させること

ができる。

遺伝子治療を用い、対象者の関連細胞によって本ポリペプチドの内因性産生を行わせることができる。遺伝子治療は、欠陥のある遺伝子を修正した治療用遺伝子と置き換えることによって、前記ポリペプチドの不適切な生成を永久的に治療することに用いられる。

本発明の遺伝子治療は、*in vivo*または*ex vivo*で実施することができる。*ex vivo*遺伝子治療は、患者の細胞の単離および精製、治療用遺伝子の導入、および遺伝的に改変した細胞を患者に戻して導入することを必要とする。対照的に、*in vivo*遺伝子治療は、患者の細胞の単離および精製を必要としない。

治療用遺伝子は、患者に投与するために、典型的には“パッケージング”されている。遺伝子デリバリービヒクルは、リポソームのような非ウイルス性、または、例えばK.L. Berkner (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 39 - 66に記載されているアデノウイルスのような複製欠損ウイルスもしくはN. Muzyczka (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 97 - 129および米国特許第5,252,479号に記載されているアデノ付随ウイルス(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は、複製欠損レトロウイルスベクターで発現させるために、操作され得る。次に、この発現構築物は単離されて、前記ポリペプチドをコードするRNAを含有する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細胞に導入され得る。その結果、前記パッケージ細胞は、対象の遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を産生することができるようになる。これらのプロデューサー細胞は、*in vivo*で細胞を操作するため及び*in vivo*でポリペプチドを発現させるために、対象者に投与することができる(以下を参照されたい: *Gene Therapy and Other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches*, Chapter 20 (およびその中に引用された文献), “*Human Molecular Genetics*” (1996) T. Strachan & A.P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd.)。 10 20

【0066】

別のアプローチは“裸のDNA”の投与で、この場合、治療用遺伝子が血流または筋肉組織に直接注射される。

本発明のポリペプチドまたは核酸分子が疾患をひき起こす原因物質である場合には、本発明は、前記疾患をひき起こす原因物質に対する抗体を生成するワクチンとして用いることができる前記ポリペプチドまたは核酸分子を提供する。前述のポリペプチドまたは核酸分子がアップレギュレートされるものである場合、ワクチン開発は、そのような原因物質に対する抗体またはT細胞を産生させることを含み得る(W000/29428に記載されるように)。 30

本発明のワクチンは、予防的(すなわち、感染を防ぐ)であっても治療的(すなわち、感染後の疾患を治療する)であってもよい。そのようなワクチンは、免疫性を付与する抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質または核酸を、通常は上記で述べた医薬的に許容できる担体と組合せて含む。前記担体には、組成物を投与される個体に対して有害な抗体の産生をそれ自体で誘発しない担体のいずれもが含まれる。さらに、これらの担体は免疫刺激剤(“アジュバント”)として機能してもよい。さらにまた、前記抗原または免疫原は、細菌の類毒素(例えばジフテリア、破傷風、コレラ、H.ピロリ菌(*pyroli*)由来の類毒素)および他の病原体と結合されてもよい。 40

ポリペプチドは胃で分解されるので、ポリペプチドを含むワクチンは、好ましくは非経口的に(例えば皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射)投与される。非経口投与に適した製剤には、水性および非水性の無菌注射溶液、並びに水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。前記無菌注射溶液は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤をレシピエントの血液に対して等張にする溶質を含んでいてもよく、前記無菌懸濁剤は、懸濁剤または増粘剤を含んでもよい。

【0067】

本発明のワクチン製剤は、単位用量または複数単位用量の容器で提供されてもよい。例えば、密封されたアンプルおよびバイアルでの提供は、使用直前に無菌液状担体を添加することのみを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。投与量はワクチンの比活 50

性に依存し、日常的な検査によって容易に決定することができる。

本発明のポリペプチドと結合する抗体の遺伝学的デリバリーも、例えば国際特許出願WO 98/55607に記載されるように、実施することができる。

ジェットインジェクション（例えば、www.powderject.comを参照されたい）に関する技術も、ワクチン組成物の製剤化に有用であろう。

ワクチン接種およびワクチンデリバリーシステムに適する多数の方法は、国際特許出願W000/29428に記載されている。

本発明はまた、診断薬としての本発明の核酸分子の使用に関する。本発明の核酸分子により特徴付けられ、機能不全に付随する遺伝子の変異型の検出は、前記遺伝子の過小発現、過剰発現または位置的もしくは時間的発現の変化から生じる疾患の診断、またはそのよ

10

うな疾患に対する感受性の診断を規定するかまたはそれら診断に付け加えることができる診断ツールを提供する。前記遺伝子に変異を保有する個体は、種々の技術によってDNAレベルで検出することができる。

診断のための核酸分子は、対象者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料から入手できる。ゲノムDNAを直接検出に用いてもよいし、またはPCR、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）もしくは他の増幅技術を分析に先立って用いることによって、ゲノムDNAを酵素的に増幅してもよい（以下の文献を参照されたい：Saiki et al., Nature 324: 163 - 166(1986); Bej et al., Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol., 26: 301 - 334(1991); Birkenmeyer et al., J. Virol. Meth., 35: 117 - 126(1991); Van B runt, J., Bio/Technology, 8: 291 - 294(1990)）。

20

【0068】

ある態様では、本発明のこの特徴は、本発明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こと、および前記発現レベルをコントロールのレベルと比較することを含む、患者における疾患を診断する方法を提供する。この場合、前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する。前記方法は、以下の工程を含み得る：

a) 本発明の核酸分子と核酸プローブとの間で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、患者由来の組織サンプルを前記核酸プローブと接触させる工程；

b) 工程a) で用い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；および、

30

c) 前記サンプル中のハイブリッド複合体の存在を検出する工程；

この場合、コントロールサンプル中のハイブリッド複合体レベルと異なるハイブリッド複合体レベルが患者サンプルで検出されることは、疾患を示唆する。

本発明のさらなる特徴は、以下の工程を含む診断方法を含む：

a) 疾患について検査される患者から、組織サンプルを入手する工程；

b) 前記組織サンプルから、本発明の核酸分子を単離する工程；および、

c) 疾患に付随する前記核酸分子における変異の存在を検出することによって、患者を疾患について診断する工程。

【0069】

上記に記載した方法における核酸分子の検出を補助するために、増幅工程、例えばPCRの使用が含まれ得る。

40

正常な遺伝子型と比較すると、増幅産物におけるサイズの変化によって、欠失および挿入が検出される。点変異は、増幅DNAを本発明の標識RNAとハイブリダイズさせるか、あるいは本発明の標識アンチセンスDNA配列とハイブリダイズさせることによって同定することができる。完全にマッチした配列は、RNase消化によって、または溶融温度における差異を評価することによって、ミスマッチを有する二重鎖と区別することができる。DNAをストリンジェントな条件下で前記DNAとハイブリダイズする核酸プローブと接触させてハイブリッド二本鎖分子を形成させること（前記ハイブリッド二本鎖は、疾患に付随する変異に対応するいずれかの部分で前記核酸プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分を有する）、および、前記プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分の有無を前記DNA鎖の

50

対応部分における疾患付随変異の有無を示すものとして検出することによって、患者における変異の有無を検出することができる。

前記のような診断は特に出生前検査で有用であり、新生児検査でもなお有用である。

【0070】

参照遺伝子と“変異”遺伝子との間の点変異および他の配列的相違は、他の周知の技術、例えば直接DNAシーケンシングまたは一本鎖構造多型性(Orita et al., Genomics, 5: 874 - 879(1989))によって同定できる。例えば、シーケンシングプライマーは、二本鎖PCR産物または改変PCRによって作製された一本鎖テンプレート分子とともに用いることができる。配列決定は、放射能標識ヌクレオチドを用いる通常の方法によって、または蛍光タグを用いる自動シーケンシング法によって実施される。クローン化DNAセグメントを、特異的DNAセグメントを検出するためのプローブとして用いることもできる。この方法の感受性は、PCRと併用したとき極めて増強される。さらに、点変異および他の配列の変動(例えば多型性)は、例えば対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドをただ1つのヌクレオチドが異なる配列のPCR増幅に用いることによって、上記のように検出することができる。

10

DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下または非存在下でのゲル内のDNAフラグメントの電気泳動移動度における変化によって、または直接DNAシーケンシング(例えば、Myers et al., Science (1985) 230: 1242)によっても検出することができる。特定の位置における配列の変化はまた、RNaseおよびS1保護のようなヌクレアーゼ保護アッセイによって、または化学切断法(Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85: 439

20

【0071】

ミクロ欠失、異数性、転座、逆位のような変異は、通常のゲル電気泳動およびDNAシーケンシングの他に、in situ分析によっても検出できる(例えば以下を参照されたい: Keller et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, New York, N.Y., USA(1993))。すなわち、細胞内のDNAまたはRNA配列は、それらを単離および/またはメンブレン上に固定する必要なしに、変異について分析することができる。蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)は、現在のところ最も一般的に用いられている方法で、FISHに関する多数の概論が存在する(例えば以下を参照されたい: Trachuck et al., Science, 250, 559-562(1990); およびTrask et al., Trends, Genet., 7, 149-154(1991))。

30

本発明の別の態様では、本発明の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、遺伝的変種、変異および多型性の効率的スクリーニングを実施することができる。アレイ技術方法はよく知られていて一般的な応用性を有しており、遺伝子発現、遺伝連鎖および遺伝的可変性を含む分子遺伝学における種々の疑問に取り組むのに用いることができる(例えば以下を参照されたい: M. Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp610-613)。

【0072】

ある態様では、前記アレイが、以下の文献に記載されている方法にしたがって調製され使用される(PCT出願W095/11995(Chee et al.); D.J. Lockhart et al.(1996) Nat. Biotech. 14: 1675 - 1680; M. Schena et al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 10614 - 10619)。オリゴヌクレオチド対は、2つから100万個を越える範囲にわたり得る。前記オリゴマーは、光誘導化学法を用いて基板上の指定領域で合成される。基板は、紙、ナイロンまたは他の種類のメンブレン、フィルター、チップ、ガラススライドもしくは他の適切な固相支持体のいずれであってもよい。別の特徴では、オリゴヌクレオチドは、PCT特許出願(W095/251116, Baldeschweiler et al.)に記載されているように、化学的結合方法およびインクジェット応用装置を用いることによって基板表面上で合成することができる。別の特徴では、ドット(またはスロット)プロットに類似する“格子化(gridged)”アレイが、真空系、熱結合方法、UV結合方法、機械的または化学的結合方法を用いて基質表面にcDNAフラグメントまたはオリゴヌクレオチドを配置すること及び連結させることに用いられ得る。上述するようなアレイは、手動で、または利用可能な装置(スロットブ

40

50

ロットまたはドットプロット装置)、材料(適切な固相支持体すべて)および機械(口ボット機器を含む)を用いて作製することができ、8、24、96、384、1536または6144個のオリゴヌクレオチド、または2つから100万個を越える範囲の他のいずれの数をも含むことができる(このことは、アレイ自体を商業的に入手可能な計測器の有効利用に向くものとしている)。

【0073】

上記で考察する方法の他に、対象者に由来するサンプルから、ポリペプチドまたはmRNAの異常な増加または低下のレベルを決定することを含む方法によって、疾患を診断することができる。発現低下または発現増加は、例えば、核酸増幅、一例を挙げるとPCR、RT-PCR、RNase保護、ノーザンプロット法および他のハイブリダイゼーション方法のようなポリヌクレオチドの定量のために当技術分野で周知の方法のいずれかを用いて、RNAレベルで測定することができる。

宿主に由来するサンプルで本発明のポリペプチドレベルを決定することに用いることができるアッセイ技術は当業者によく知られており、また上記でいくらか詳細に考察されている(ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンプロット分析およびELISAアッセイを含む)。本発明のこの特徴では、以下の工程を含む診断方法が提供される:(a)上記のようなリガンドを、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適する条件下で、生物学的サンプルと接触させる工程;および(b)前記複合体を検出する工程。

ELISA、RIAおよびFACSのようなポリペプチドレベルを測定するためのプロトコルは、ポリペプチド発現の変化レベルまたは異常レベルを診断するための基礎をさらに提供することができる。ポリペプチド発現の正常値または標準値は、正常な哺乳類対象体(好ましくはヒト)から得られた体液または細胞抽出物を、複合体形成に適した条件下で、前記ポリペプチドに対する抗体と混合することによって確立される。標準的な複合体形成量は、種々の方法、例えば分光測定方法によって定量することができる。

【0074】

本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体は、前記ポリペプチドの発現によって特徴付けられる症状または疾患の診断のために、または本発明のポリペプチド、核酸分子、リガンドおよび他の化合物を用いて治療されている患者をモニターするアッセイにおいて、用いることができる。診断目的に有用な抗体は、治療薬として上記で述べたのと同じ様式で調製することができる。前記ポリペプチドについての診断アッセイは、前記抗体および標識を用いてヒトの体液または細胞もしくは組織の抽出物中のポリペプチドを検出する方法を含む。前記抗体は改変して、または改変せずに用いることができ、さらにそれらをレポーター分子と共有結合または非共有結合によって結合させることによって標識することができる。当技術分野で公知の多様なレポーター分子を用いることができ、それらのいくつかは上記に記載されている。

生検組織由来の、対象者、コントロールおよび疾患サンプルで発現されているポリペプチドの量は、標準値と比較される。標準値と対象者の値との間の偏差は疾患診断のためのパラメータを確立する。診断アッセイを用いて、ポリペプチド発現の有無および過剰を識別し、治療的処置の間のポリペプチドレベルの調節をモニターすることができる。そのようなアッセイはまた、動物実験、臨床試験または個々の患者の治療モニタリングにおける特定の治療的処置方法の有効性を評価することに用いることができる。

【0075】

本発明の診断キットは、以下を含み得る:

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

本発明のある特徴では、診断キットが、ストリンジェントな条件下で本発明の核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器;前記核酸分子を増幅させるために有用なプライマーを含む第二の容器;および、疾患の診断を容易にするために前記プローブおよびプライマーの使用についての指示書を含み得る。前記キットは、ハイブリダイズ

していないRNAを消化するための薬剤を保持している第三の容器をさらに含んでもよい。

本発明の別の特徴では、診断キットが核酸分子のアレイを含んでもよく、前記核酸分子の少なくとも1つが本発明の核酸分子であってもよい。

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つまたは2つ以上の抗体；および、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；を含み得る。

【0076】

そのようなキットは、疾患または疾患に対する感受性、特に細胞増殖性疾患、自己免疫/炎症性疾患、心臓血管系疾患、神経障害、発育異常、代謝異常、感染および他の病的状態に対する感受性を診断する場合に有用であろう。前記の疾患または異常は、好ましくはシスチンノットフォールドサイトカインの異常なレベル、好ましくはDANサブファミリーのメンバーの異常なレベルが関与している異常または疾患である。前記疾患または異常は、シスチンノットフォールドサイトカインのリガンドの異常なレベル、好ましくはDANサブファミリーのメンバーのリガンドの異常なレベルが関与しているものであってもよい。例えば、前記疾患または異常が、TGF スーパーファミリーメンバーの異常なレベルが関与しているものであり得る。特に、前記疾患または異常は、BMPが関与しているもの、例えば神経障害、糖尿病性腎障害のような腎障害、癌、創傷治癒、線維症、骨減少症、骨粗しょう症、骨折およびスクレロステオーシスであり得る。

本発明の種々の特徴および態様は、特にINSP035ポリペプチドに関連する実施例を介して、これからより詳細に説明されるであろう。

本発明の範囲を逸脱することなく細部の改変がなされ得ることは、理解されるであろう。

【0077】

(実施例)

実施例1：配列データベースのタンパク質とINSP002タンパク質との比較

配列番号：2および配列番号：4を組合せることにより得られるポリペプチド配列は、INSP002の連続するエクソンの翻訳物であり、NCBI非重複的配列データベースに対するBLAST検索物(query)として前記ポリペプチド配列を用いた。上位10個の適合物にはケルベロスまたはケルベロス関連タンパク質として注釈付けられている配列が含まれ、その配列はシスチンノットファミリーのメンバーであって、且ついずれもが高度に有意なE値(E-value) ($2E^{-10}$ から $3E^{-06}$) を有して検索配列にアラインメントする(図1)。図2は、INSP002検索配列のホモサピエンスケルベロス関連1タンパク質配列(Feng et al. 2001)に対するアラインメントを示している。

配列番号：2および配列番号：4を組合せることにより得られるポリペプチド配列は、INSP002の連続するエクソンの翻訳物であり、SignalPV2.0.b2(Nielsen et al. 1997 Protein Eng 1: 1-6)に前記ポリペプチド配列を入力した。このプログラムによって、前記ポリペプチド配列はシグナルペプチドを有することが予測された。前記シグナルペプチドの最も可能性のある切断部位は、配列番号：2および配列番号：4を組合せて得られるポリペプチド配列INSP002の残基22と23との間に見出される。

配列番号：2エクソン1ポリペプチドをコードする配列番号：1のヌクレオチド配列は、5'非翻訳領域(5' UTR)およびタンパク質コード配列(CDS)を含む。前記CDSは、ヌクレオチド152から開始する。

【0078】

実施例2：BLAST検索の再実施

NCBI-nrおよびNCBI-ntデータベースのBLAST検索を、配列番号：2および配列番号：4を組合せることにより得られる配列番号：6のポリペプチド配列を用いて、2002年11月26日に実施した。これらの検索によって同定された上位4つのヒットは、図3に示されている。

これらの検索によって、INSP002ポリペプチドは、仮説的タンパク質FLJ38607とアミノ酸レベルで同一であることが明らかにされた。FLJ38607に対応するヌクレオチド配列AK09

10

20

30

40

50

5926は、心臓からクローニングされて2002年7月16日に寄託されていた。図4は、INSP002検索配列のAK095926 c DNAクローンに由来するタンパク質とのアラインメントを示している。

INSP002について予測されるエクソン1およびエクソン2スプライス連結部(splice junction)は、AK095926の存在によって実験的に証明される。

【0079】

```

450      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
451 GATGTGTAAGGCTGTGCCCTTCGTTTCAG          GTGTTCTCCCGGC
      |||
10225 GATGTGTAAGGCTGTGCCCTTCGTTTCAGGTG...CAGGTGTTCTCCCGGC
      エクソン1          エクソン2
500      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
492 CCGGCTGCTCAGCCATACGCCTCCGAAATCATCTGTGCTTTGGTCATTGC
      |||
13670 CCGGCTGCTCAGCCATACGCCTCCGAAATCATCTGTGCTTTGGTCATTGC

```

10

20

【0080】

これらの検索によって、INSP002の幾つかの部分が2002年3月8日に寄託されたIMAGEクローン4558384 (BC025333.1) と同一であることも明らかにされた。図5は、部分的なINSP002検索配列とIMAGEクローン4558384とのアラインメントを示している。

【0081】

実施例3：INSP002のc DNAの部分的クローニング

i) c DNAライブラリー

ヒトc DNAライブラリー(バクテリオファージラムダ()ベクター中に入っている)は、StratageneもしくはClontechから購入するか、またはSerono Pharmaceutical Research Instituteで製造元(Stratagene)のプロトコルにしたがってZAPもしくはGT10ベクター中に調製した。バクテリオファージDNAは、感染させた大腸菌宿主株の小規模培養物から製造元(Promega, Corporation, Madison WI.)の指示にしたがいWizard Lambda Preps DNA精製系を用いて調製した。用いたライブラリーおよび宿主株のリストは、表Iに示されている。

30

ii) ファージライブラリーDNAに由来する実質上c DNAのPCR

INSP002をコードする部分的c DNA(図6)は、遺伝子特異的クローニングプライマー(INSP002-CP1およびINSP002-CP2、図6および表II)を用いて159 bp(図7)のPCR産物として得られた。PCRは、1 XのAmpliTaq(登録商標)緩衝液、200 μMのdNTP、各々50ピコモルのクローニングプライマー、2.5ユニットのAmpliTaq(登録商標)(Perkin Elmer)および各々100ngのファージライブラリーDNAを含む最終容積50 μLで、次のようにプログラムしたMJリサーチDNAエンジンを用いて行った：94 °にて1分；94 °にて1分、x °にてy分、および72 °、を40サイクル(ここでxは最低Tm - 5 °で、yは産物1kbにつき1分である)；続いて72 °にて1分を1サイクル行ってから、4 °にて保持サイクル。

40

増幅産物は、1 xのTAE緩衝液(Invitrogen)中0.8%のアガロースゲルで可視化し、予測される分子量で移動したPCR産物をWizard PCR Preps DNA精製系(Promega)を用いてゲルから精製した。50 μLの滅菌水に溶出させたPCR産物を、直接サブクローニングするか、または-20 °で保存した。

iii) PCRのための遺伝子特異的クローニングプライマー

仮想的c DNAの完全長および部分的配列を増幅するために、プライマーデザイナーソフトウェア(Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045

50

、USA)を用いて、18-25塩基の長さを有するPCRプライマー対をデザインした。PCRプライマーは、 55 ± 10 に近い T_m および40-60%のGC含量をもつように最適化した。標的配列INSP002に対して高い選択性を有するプライマー(他のテンプレートに対して、ほとんどまたは全く非特異的プライミングを示さない)を選択した。

【0082】

iv) PCR産物のサブクローニング

PCR産物を、インビトロジェン社(Invitrogen Corporation)から購入したTOP0 TAクローニングキットを用い製造元に指定されている条件を用いて、トポイソメラーゼI改変クローニングベクター(pCR II TOP0)中にサブクローニングした(それぞれcat. No. K4600-01およびK4575-01)。簡単に記すと、ヒトライブラリー-胎児腎ライブラリー(ライブラリー番号12)増幅に由来する4 μ Lのゲル精製PCR産物を、1 μ LのTOP0ベクターおよび1 μ Lの塩溶液とともに室温にて15分間インキュベートした。続いて前記反応混合物で大腸菌株TOP10(Invitrogen)を次のように形質転換した。ワンショットTOP10細胞の50 μ Lアリコート氷上で解凍してから、2 μ LのTOP0反応物を添加した。前記混合物を氷上で15分間インキュベートし、続いて42 $^{\circ}$ Cにて正確に30秒間のインキュベーションによってヒートショック処理した。サンプルを氷上に戻し、250 μ Lの温SOC培地(室温)を添加した。サンプルを、振盪しながら(220rpm)37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。続いて形質転換混合物をアンピシリン(100 μ g/mL)含有L-ブロス(LB)プレート上に蒔いて、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。cDNAインサートを含むアンピシリン耐性コロニーを、コロニーPCRによって同定した。

10

20

v) コロニーPCR

滅菌つま楊枝を用いて、コロニーを50 μ Lの滅菌水に接種した。続いて接種物の10 μ Lアリコートを、使用したプライマー対がSP6およびT7であったことを除き、上述のように20 μ Lの全反応容積でPCRを行った。サイクリング条件は以下のとおりであった: 94 $^{\circ}$ Cにて2分; 94 $^{\circ}$ Cにて30秒、47 $^{\circ}$ Cにて30秒および72 $^{\circ}$ Cにて1分、を30サイクル; 72 $^{\circ}$ Cにて7分を1サイクル。続いて更なる分析の前にサンプルを4 $^{\circ}$ Cで維持した(保持サイクル)。

PCR反応産物を、1xのTAE緩衝液中において1%アガロースゲル上で分析した。予測されるPCR産物サイズ(159bpのcDNA+187bp(マルチクローニングサイトまたはMCSのため))を示すコロニーを、アンピシリン(100 μ g/mL)含有L-ブロス(LB)5mL中で、220rpmにて振盪しながら37 $^{\circ}$ Cにて一晩増殖させた。

30

vi) プラスミドDNAの調製およびシーケンシング

MiniprepプラスミドDNAを、Qiaprep Turbo9600自動システム(Qiagen)またはWizard Plus SV Miniprepキット(Promega Cat.# 1460)を用い、製造元の指示にしたがって5mLの培養物から調製した。プラスミドDNAを100 μ Lの滅菌水に溶出させた。そのDNA濃度を、エッペンドルフB0分光計を用いて測定した。BigDye Terminatorシステム(Applied Biosystems Cat.# 4390246)を用い製造元の指示にしたがいながら、プラスミドDNA(200-500ng)をT7およびSP6プライマーと共にDNAシーケンシングした。Dye-Exカラム(Qiagen)またはMontage SEQ 96クリーンアッププレート(Millipore cat.#LSKS09624)を用いてシーケンシング反応物を精製し、続いてApplied Biosystems 3700シーケンサーで分析した。

40

vii) INSP002含有cDNAライブラリーの同定

INSP002-CP1およびINSP002-CP2を用いて得られ、且つ正しいサイズ(159bp)で移動するPCR産物を、皮質、結腸、胎児肺および胎児腎のcDNAライブラリー(ライブラリー8、9、11および12)において同定した。pCR II-TOP0ベクター中にクローニングされているPCR産物の配列は図7に示されており、そのプラスミドマップは図8に示されている(プラスミド番号13422)。予測INSP002ヌクレオチド配列とクローン化部分的ヌクレオチド配列とのアラインメント(図9a)、および予測INSP002タンパク質配列とクローン化部分的タンパク質配列とのアラインメント(図9b)によって示されるように、クローン化部分的cDNAは、INSP002エクソン2の一部である。

【0083】

50

実施例 4 : Image : 4558384から INSP002ORFの作製

網膜芽細胞腫由来の Imageクローン4558384 (プラスミドp0TB7中に入っている) は、 Res gen (Invitrogen Corp) から購入した。4558384の大腸菌スタップをアンピシリン含有 (100 μ g / m L) LBプレート上に蒔いて、37 °Cで一晩増殖させた。単一のアンピシリン耐性コロニーをアンピシリン含有 (100 μ g / m L) LB 5mLに接種し、220rpmで振盪しながら37 °Cで一晩インキュベートした。実施例 3 の vi) で述べるように、SP6、T7、M13F、INSP002-C P1および INSP002-CP2プライマーを用いて、Mini prepプラスミドDNAを調製し、シーケンシングした。

インサートの配列は図10に示されている。Image 4558384 c DNAのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列と INSP002とのアラインメントは、図11に示されている。Image 4558384 c DNAは、INSP002のサブライバントのようである。Image 4558384 c DNAは、前記 INSP002予測配列と比較して、フレームシフトおよび未成熟終止コドンを導入する87bpのインサートを含む。さらに3' 非翻訳配列は、前記cDNAのゲノムDNA混入を示すA1aリピートを含んでいる。Image 4558384のエクソン2およびエクソン4は、INSP002の予測エクソン1およびエクソン2と等価である。しかしながら、Image 4558384は、INSP002予測配列のエクソン1とエクソン2との間に余分な (extra) エクソンを組込んでいる。前記余分なエクソンは、シスチンノットドメインの翻訳を妨げる未成熟終止コドンをコードする。Image 4558384のサブライバ境界は、次のとおりである：

【 0 0 8 4 】

```

500      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
492 GGCTGTGCCCTTCGTTTCAG          ACACGGGAGTCTCGCTATGTTG
      |||
10234 GGCTGTGCCCTTCGTTTCAGGTG...TAGACACGGGAGTCTCGCTATGTTG
      エクソン2                      エクソン3
550      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
533 CCCAAGCTAGTCTTGAGCTTCTGGCCTCAAGCAATCCTCCCACCTCAGCC
      |||
10741 CCCAAGCTAGTCTTGAGCTTCTGGCCTCAAGCAATCCTCCCACCTCAGCC

600      .      :      .      :      .      :      .      :      .      :
583 TCCTGAGTTCTAG          GTGTTCTCCCGGCCCGGCTGCTCAGCCA
      |||
10791 TCCTGAGTTCTAGGTG...CAGGTGTTCTCCCGGCCCGGCTGCTCAGCCA
      エクソン4

```

【 0 0 8 5 】

INSP002のORFをコードする完全長の c DNAを作製するために、ゲノムDNAを除去するPCR戦略を考案した。PCRプライマーをデザインして、前記 Imageクローン内の87bpのインサートとフランキングしている INSP002配列の5' 末端 (上流) および3' 末端 (下流) を増幅させた。上流配列のリバースプライマーおよび下流配列のフォワードプライマーはそれぞれその3' 末端および5' 末端に相補的な配列を含んでおり、オーバーラップする末端を提供し、よって各反応のPCR産物を一緒に混合してアニールさせることができ、第三のPCR反応では入れ子 (nested) 上流フォワードプライマーおよび入れ子下流リバースプライマーを用いて完全長のcDNAを増幅させることができる。

INSP002の5' 末端 (87bpのインサートの上流) を増幅させるための第一のPCR反応物は、50 μ Lの最終容積中に以下を含んでいた：5 μ Lの10× Platinum Pfx緩衝液、1.5 μ LのdN

10

20

30

40

50

TP (10mM)、1 μ LのMgSO₄ (50mM)、1.5 μ LのINSP002V-5' -F (10 μ M)、1.5 μ LのINSP002V-5' -R (10 μ M)、0.75 μ LのPlatinum Pfxおよび135ngのIMAGE: 4558384プラスミドc DNA。増幅条件は、94 にて2分間を1サイクル; 94 にて15秒間および68 にて1分間を30サイクル; 68 にて7分間を1サイクル、であった。INSP002の3' 末端 (87bpのインサートの下流) を増幅させるための第二のPCR反応は、プライマーがINSP002V-3' -FおよびINSP002V-3' -Rであるという点を除いて、同じ条件下で実施した。

【0086】

増幅産物は、1 \times TAE緩衝液 (Invitrogen) 中で0.8%アガロースゲル上で可視化した。予測される分子量 (PCR1およびPCR2について、それぞれ520bpおよび448bp) で移動したPCR産物を、Wizard PCR Preps DNA精製システム (Promega) を用いて前記ゲルから精製した。PCR産物を50 μ Lの滅菌水に溶出させて、エッペンドルフB0分光計を用いてDNA濃度を測定した。続いて精製PCR産物の各々の50ngを入れ子PCRのためのテンプレートとして以下を含む50 μ Lの反応物で用いた: 5 μ Lの10 \times Platinum Pfx緩衝液、1.5 μ LのdNTP (10mM)、1 μ LのMgSO₄ (50mM)、1.5 μ LのINSP002V-5' nest-F (10 μ M) および1.5 μ LのINSP002V-3' nest-R (10 μ M)。反応混合物を95 にて3分間加熱し、0.75 μ LのPlatinum Pfxポリメラーゼを添加した。増幅条件は以下のとおりであった: 94 にて2分間を1サイクル; 94 にて15秒間、61 にて30秒間および68 にて1分間を30サイクル; 68 にて7分間を1サイクル。719bpの予測される分子量で移動したPCR産物を、Wizard PCR Preps DNA精製システムを用いてゲルから精製して、50 μ Lの滅菌水に溶出させた。続いて前記精製PCR産物の4 μ Lを、セクション1.4で述べたように、pCR4 blunt TOP0ベクターに連結した。セクション1.5で述べたように、アンピシリン耐性コロニーを、T3およびT7プライマーを用いるコロニーPCRによってインサートについてテストした。予測されるPCR産物サイズ (719bp + 106bp (マルチクロニング部位またはMCSのため)) を与えるコロニーを、アンピシリン含有 (100 μ g/mL) LB 5mL中、220rpmで振盪しながら、37 にて一晩増殖させた。ミニプレッププラスミドDNAを培養物5mLから調製して、セクション1.6に記載したように、T3およびT7プライマーを用いてシーケンシングした。得られたクローンの1つの配列および対応するプラスミドマップ (pCR4 blunt TOP0-INSP002V) は、それぞれ図12および13に示されている。

クローン化配列の翻訳によって、予測されるINSP002配列と比較して、INSP002Vは2つのアミノ酸欠失 (V107およびQ108) および一アミノ酸置換 (F110L) を含むことが示される。予測INSP002およびINSP002Vのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列のアラインメントは、図14に示されている。

INSP002予測配列と比較すると、エクソン1とエクソン2との間のスプライス連結部は、6bpの上流供与部位を利用する。これによって、2つのアミノ酸 (ValGlu) の欠失が生じる。使用されるスプライス受容部位は、INSP002予測配列によって使用されるものと同じであるが、受容部位の後に2つのシーケンシングエラーが存在している。これによって (PheからLeuへ) アミノ酸置換が生じる。

【0087】

実施例5: HEK293/EBNA細胞でのINSP002V発現用プラスミドの構築

続いて、DNAシーケンシングによって同定したINSP002Vの完全なコード配列 (ORF) を含むpCR4 blunt-TOP0クローン (図13) を用いて、ゲートウェイ (Gateway) (登録商標) クロニング法 (Invitrogen) により、前記インサートを哺乳類細胞発現ベクターpEAK12d (図15) 中にサブクロニングした。

i) インフレイム6HISタグ配列に融合させたゲートウェイ適合性INSP002 ORFの作製

ゲートウェイクロニングプロセスの第一段階は二工程PCR反応を必要とし、これによって5' 末端にattB1組換え部位およびコザック配列がフランキングし、3' 末端にインフレイム6ヒスチジン (6HIS) タグをコードする配列、終止コドンおよびattB2組換え部位がフランキングするINSP002のORF (ゲートウェイ適合性c DNA) が作製される。第一のPCR反応物 (最終容積50 μ L) は以下を含む: 25ngのpCR4 blunt TOP0-INSP002V (プラスミド13075、図13)、1.5 μ LのdNTP (10mM)、5 μ Lの10 \times Pfxポリメラーゼ緩衝液、1 μ LのMgSO₄ (

50mM)、各々0.5 μ Lの遺伝子特異的プライマー(100 μ M)(INSP002V-EX1およびINSP002 VEX2)、ならびに0.5 μ LのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ(Invitrogen)。PCR反応は、95 $^{\circ}$ Cにて2分間の最初の変性工程、続いて94 $^{\circ}$ Cにて15秒および68 $^{\circ}$ Cにて30秒を12サイクル、を用いて実施した。Wizard PCR prepDNA精製システム(Promega)を用い製造元の指示にしたがって、反応混合物からPCR産物を直接精製した。第二のPCR反応物(最終容積50 μ L)は以下を含んでいた: 10 μ Lの精製PCR産物、1.5 μ LのdNTP(10mM)、1 μ LのMgSO₄(50mM)、5 μ Lの10 \times Platinum Pfxポリメラーゼ緩衝液、各々0.5 μ Lのゲートウェイ変換プライマー(100 μ M)(GCPフォワードおよびGCPリバース)、ならびに0.5 μ LのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ。第二のPCR反応の条件は以下のとおりであった: 95 $^{\circ}$ Cにて1分間; 94 $^{\circ}$ Cにて15秒、45 $^{\circ}$ Cにて30秒および68 $^{\circ}$ Cにて3.5分を4サイクル; 94 $^{\circ}$ Cにて15秒、55 $^{\circ}$ Cにて30秒および68 $^{\circ}$ Cにて3.5分を25サイクル。PCR産物は上記のように精製した。

【0088】

ii) ゲートウェイ適合性 INSP002V ORFのゲートウェイエンターベクター pDONR201および発現ベクター pEAK12d へのサブクローニング

ゲートウェイクローニング方法の第二段階は、ゲートウェイ改変PCR産物のゲートウェイエンターベクター pDONR201(Invitrogen, 図16)へのサブクローニングを含む。前記サブクローニングは、以下のものである: 5 μ Lの精製PCR産物を、1.5 μ Lの pDONR201ベクター(0.1 μ g/ μ L)、2 μ LのBP緩衝液および1.5 μ LのBPクロナーゼ(clonase)酵素ミックス(Invitrogen)とともに、室温で1時間インキュベートした。この反応をプロテイナーゼK(2 μ g)の添加によって停止させ、さらに10分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。バイオラド=ジーンパルサー(Biorad Gene Pulser)を用いるエレクトロポレーションによって、前記の反応物のアリコート(2 μ L)を大腸菌DH10B細胞へ形質転換した。形質転換体をLB-カナマイシンプレート上に蒔いた。Wizard Plus SV Miniprepsキット(Promega)を用いて、得られたコロニーの1-4からプラスミドミニ-プレップDNAを調製し、続いて1.5 μ Lの前記プラスミド溶出物を組換え反応物に用いた。前記組換え反応物は、最終容積10 μ L中に、1.5 μ LのpEAK12dベクター(図9)(0.1 μ g/ μ L)、2 μ LのLR緩衝液および1.5 μ LのLRクロナーゼ(Invitrogen)を含んでいた。この混合物を室温で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、さらに10分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。この反応物のアリコート(1 μ L)を用いて、エレクトロポレーションにより、大腸菌DH10B細胞を形質転換した。

正しいインサートを含むクローンを、pEAK12dプライマー(pEAK12d FおよびpEAK12d R)をPCRに用いたことを除き、上に記載するようにコロニーPCRを行うことによって同定した。Qiaprep Turbo 9600自動化システム(Qiagen)を用いるか、またはWizard Plus SV miniprepsキット(Promega)により手動で、正しい挿入物を含むクローンからプラスミドmini prep DNAを単離して、pEAK12d FおよびpEAK12d Rプライマーを用いて配列を確認した。

配列を確認したクローンの500mL培養物から、プラスミドpEAK12d-INSP002V-6HIS(プラスミド番号13227、図17)のCsCl勾配精製maxi-prepDNAを調製して(J. Sambrook, et al., in Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、滅菌水に1 μ g/ μ Lの濃度で再懸濁して-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0089】

iii) 発現ベクター pEAK12dの構築

ベクターpEAK12dは、哺乳類細胞発現ベクターpEAK12(Edge Biosystemsから購入)のゲートウェイクローニング系適合型である。pEAK12では、対象cDNAがヒトEF1プロモーターの制御下で発現される。pEAK12dは、下記のように作製した。

pEAK12は、制限酵素HindIIIおよびNotIで消化し、クレノウ(Klenow)(New England Biolabs)を用いて平滑末端にし、仔ウシ腸アルカリホスファターゼ(Roche)を用いて脱リン酸化した。脱リン酸化後、平滑末端のゲートウェイリーディングフレームカセットC(ゲートウェイベクター変換系、Invitrogen cat#11828-019)に前記ベクターを連結して、大腸菌DB3.1細胞(ccdB遺伝子を含むベクターの増殖を許容する)を形質転換した。前記

カセットは、ccdB遺伝子にフランキングなAttR組換え部位を含み、クロラムフェニコール耐性を有する。前記ベクターを連結した前記カセットで、Wizard Plus SV Miniprepsキット (Promega) を用いていくつかの耐性コロニーからMini prep DNAを単離し、AseI / EcoRIで消化して、前記カセットが正しい方向性で挿入されたことを示している670bpのフラグメントが生じるコロニーを同定した。得られたプラスミドをpEAK12d (図15) と名付けた。

【0090】

実施例6 : INSP002-SV-6HIS-V1 (プラスミド番号13227) の哺乳類細胞での発現および精製

エプスタイン=バーウイルスの核抗原を発現しているヒト胚性腎293細胞 (HEK293-EBNA, Invitrogen) は、Ex 細胞VPRO無血清培地 (シードストック、維持培地、JRH) に懸濁状態で維持した。トランスフェクションの16-20時間前 (-1日目) に、細胞を2つのT225フラスコに播種した (2% FBS播種培地 (JRH) を含むDMEM / F12 (1 : 1) 中に 2×10^5 細胞 / mlの密度でフラスコ当たり50mL)。次の日 (トランスフェクション0日目)、JetPEI (登録商標) 試薬を用いてトランスフェクションを行った (プラスミドDNA $2 \mu\text{L} / \mu\text{g}$ 、PolyPlus-トランスフェクション)。各フラスコについて、113 μg のプラスミド番号13227を2.3 μg のGFP (蛍光レポーター遺伝子) とコトランスフェクトした。続いて、トランスフェクション混合物を2つのT225フラスコに加え、37 (5%のCO₂) で6日間インキュベートした。より多くの材料を得る機会を増やすために、合計200mLを作製するように、さらに2つのフラスコで前記の方法を繰り返した。陽性トランスフェクションの確認は、1日目および6日目に定量的蛍光試験によって実施した (Axiovert 10 Zeiss)。

6日目に (採集日)、4つのフラスコから上清 (200mL) をプールし、遠心分離して (4、400g)、固有の識別標を付したポットに入れた。

6Hisタグ付加タンパク質のQCのために (内部バイオプロセッシングQC)、アリコート (500 μL) を保持した。

【0091】

精製方法

C-末端6Hisタグを有するリコンビナントタンパク質を含む200mLの培養液サンプルを、冷緩衝液A (50mMのNaH₂PO₄; 600mMのNaCl; 8.7% (w/v) グルセロール; pH7.5) を用いて最終容積400mLに希釈した。0.22 μm の滅菌フィルター (Millipore, 500mLフィルターユニット) で前記サンプルをろ過し、500mLの滅菌培養角ビン (Nalgene) で4 で維持した。

精製は、自動サンプル添加装置 (Labomatic) に連結したVISIONワークステーション (Applied Biosystems) で4 で実施した。精製方法は、以下の2つの連続する工程を含んでいた: Niイオンで荷電されているPoros 20MC (Applied Biosystems) カラム (4.6 x 50mm、0.83mL) での金属アフィニティークロマトグラフィー、続いてセファデックスG-25中型 (Amersham Pharmacia) カラム (1.0 x 10cm) でのゲルろ過。

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) で再生させ、15カラム容積の100mM NiSO₄ 溶液で洗浄してNiイオンを再荷電し、10カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、続いて7カラム容積の緩衝液B (50mMのNaH₂PO₄; 600mMのNaCl; 8.7% (w/v) グリセロール; 400mMのイミダゾール; pH7.5) で洗浄し、最後に15カラム容積の緩衝液A (15mMのイミダゾールを含む) で平衡化した。サンプルを、Ni金属アフィニティークラム上に200mLのバッチで装荷した。Labomaticサンプル添加装置でサンプルを200mLサンプルループに移し、続いてこのサンプルをNi金属アフィニティークラム上に流速10mL/分で装荷した。サンプルループへの移動および装荷工程をもう一度繰り返して、400mLのサンプルをカラムに装荷した。前記装荷工程の終了時に、前記カラムを12カラム容積の緩衝液Aで洗浄し、続いて28カラム容積の緩衝液A (20mMのイミダゾールを含む) で洗浄した。20mMイミダゾール洗浄の間に、ゆるく付着していた混入タンパク質はカラムから溶出した。リコンビナントHisタグ付加タンパク質を、流速2mL/分、10カラム容積の緩衝液Bで最後に溶出させ、この溶出タンパク質を1.6mL画分で採集した。

二番目のクロマトグラフィー工程のために、セファデックス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KH₂PO₄; 8mMのNa₂HPO₄; pH7.2) で再生し、続いて4カラム容積の緩衝液C (137mMのNaCl; 2.7mMのKCl; 1.5mMのKH₂PO₄; 8mMのNa₂HPO₄; 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画分は、VISIONに統合されているサンプル添加装置を自動的に通過して、セファデックスG-25カラムに装荷され、2mL/分の流速の緩衝液Cでタンパク質を溶出した。脱塩サンプルを2.2mL画分で回収した。前記画分を、0.22 μmの滅菌遠心分離フィルター (Millipore) でろ過し、分注し、凍結して-80 °Cで保存した。サンプルのアリコートを用い、SDS-PAGE (4 - 12% NuPAGEゲル; Novex) ウェスタンブロットで分析した。

電気泳動に続いて、タンパク質を4 °Cにて1時間、290mAでゲルからニトロセルロースメンブレンへ電氣的に移した。前記メンブレンを、5% 粉乳を含む緩衝液E (137mMのNaCl; 2.7mMのKCl; 1.5mMのKH₂PO₄; 8mMのNa₂HPO₄; 0.1% トウイーン20 (pH7.4)) で室温にて1時間ブロッキングし、続いて2.5% 粉乳を含む緩衝液E中で2つのウサギポリクローナル抗体混合物 (G-18およびH-15、各々0.2 μg/mL; Santa Cruz) とともに4 °Cで一晩インキュベートした。室温でさらに1時間インキュベートした後、前記メンブレンを緩衝液Eで洗滌し (10分、3回)、続いて2.5% 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、HRP0399) と室温で2時間インキュベートした。緩衝液Eで洗滌 (10分、3回) した後、前記メンブレンをECLキット (Amersham Pharmacia) で1分処理した。続いて前記メンブレンをハイパーフィルム (Amersham Pharmacia) に露光し、前記フィルムを現像してウェスタンブロット画像を視覚的に分析した。

10

20

【0092】

実施例7：心臓由来の完全長INSP002のクローニング

INSP002の完全長コード配列を、以下のように心臓 cDNAからクローニングした。

i) 心臓 cDNAテンプレートの作製

ヒト心臓の総RNAをClontechから購入した。前記RNAの品質および濃度は、Agilent 2100 Bioanalyzerを用いて分析した。

cDNA合成のための反応混合物は、以下を含んでいた：12 μLの容積中に、1 μLのオリゴ(dT)₁₅プライマー (500 μg/mL、Promega cat. No. C1101)、2 μgの総RNA、1 μLのdNTP (10mM)。この混合物を65 °Cで5分加熱し、続いて氷上で冷却した。次に、以下の試薬を添加した：4 μLの5× 第一鎖 (first strand) 緩衝液、2 μLのDTT (0.1M)、1 μLのRNase0 utリコンビナントリボヌクレアーゼインヒビター (40ユニット/μL、Promega, cat. No. N2511)。さらに、1 μL (200ユニット) のSuperscript II (Invitrogen cat. No.18064-014) を添加する前に、42 °Cで2分間インキュベートした。この混合物を42 °Cで50分間インキュベートし、続いて70 °Cで15分間加熱した。RNAテンプレートを除去するために、1 μL (2ユニット) の大腸菌RNase H (Invitrogen cat. No.18021-014) を添加して、反応混合物をさらに37 °Cで20分間インキュベートした。最終反応混合物を滅菌水で200 μLに希釈し、-80 °Cで保存した。

30

【0093】

ii) PCRによるINSP002完全長コード配列のクローニング

INSP002の完全長コード配列を、次のものを含む50 μLのPCR反応混合物中で、ヒト心臓 cDNAからPCRによってクローニングした：5 μLの心臓 cDNA、5 μLの10× Pfx緩衝液、1.5 μLのdNTP (10mM)、1 μLのMgSO₄ (50mM)、1.5 μLの遺伝子特異的フォワードプライマー INSP002-FL-F (10 μM)、1.5 μLの遺伝子特異的リバースプライマー INSP002-FL-R (10 μM) および0.5 μLのPlatinum Pfx DNAポリメラーゼ (Invitrogen)。サイクリング条件は、94 °Cにて4分間を1サイクル; 94 °Cにて15秒間、55 °Cにて30秒間および68 °Cにて1分間を35サイクル; 68 °Cにて10分間を1サイクル、続いて4 °Cの保持サイクル。

40

増幅産物を1×TAE緩衝液 (Invitrogen) 中、0.8% アガロースゲル上で可視化し、予測される分子量 (589bp) で移動したPCR産物を、Qiagen MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いてゲルから精製した。PCR産物を10mMトリス-HCl (pH8.5) 50 μLに溶出させ、先 (セクション1.4) に記載するように、pCR4 blunt TOP0ベクター中にサブクローニン

50

グした。セクション1.5に記載するように、いくつかのアンピシリン耐性コロニーにコロニーPCRを行った。正しいサイズのインサート（589bp+106bp（MCSのため））を含むコロニーを、アンピシリン含有（100 μ g/mL）L-ブロス（LB）5mL中で、220rpmにて振盪しながら、37 $^{\circ}$ Cにて一晩増殖させた。Qiaprep Turbo9600自動システム（Qiagen）またはWizard Plus SV Miniprepキット（Promega Cat.# 1460）を用い製造元の指示にしたがって、MiniprepプラスミドDNAを5mLの培養物から調製し、200 - 500ngのミニプレップDNAの配列をT3およびT7プライマー（表III）を用いてセクション1.6に記載するようにシーケンシングした。クローン化配列は、図18に示されている。得られたプラスミド、pCR4-blunt TOP0-INSP002FL（プラスミド番号13514）のマップは、図19に示されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

表 I : ヒト cDNAライブラリー

ライブラリー	組織／細胞供給源	ベクター	宿主株	供給元	カタログ番号
1	ヒト胎児脳	Zap II	XL1-Blue MRF [*]	St [*]	936206
2	ヒト卵巣	GT10	LE392	C1 ^{**}	HL1098a
3	ヒト下垂体	GT10	LE392	C1	HL1097a
4	ヒト胎盤	GT11	LE392	C1	HL1075b
5	ヒト精巣	GT11	LE392	C1	HL1010b
6	ヒト黒質	GT10	LE392	本施設内	
7	ヒト胎児脳	GT10	LE392	本施設内	
8	ヒト脳皮質	GT10	LE392	本施設内	
9	ヒト結腸	GT10	LE392	C1	HL1034a
10	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	HL1065a
11	ヒト胎児肺	GT10	LE392	C1	HL1072a
12	ヒト胎児腎	GT10	LE392	C1	HL1071a
13	ヒト胎児肝	GT10	LE392	C1	HL1064a
14	ヒト骨髄	GT10	LE392	C1	HL1058a
15	ヒト末梢血単球	GT10	LE392	C1	HL1050a
16	ヒト胎盤	GT10	LE392	本施設内	
17	ヒトSHSYSY	GT10	LE392	本施設内	
18	ヒトU373細胞株	GT10	LE392	本施設内	
19	ヒトCFPoc-1細胞株	Uni Zap	XL1-Blue MRF [*]	St	936206
20	ヒト網膜	GT10	LE392	C1	HL1132a
21	ヒト膀胱	GT10	LE392	本施設内	
22	ヒト血小板	Uni Zap	XL1-Blue MRF [*]	本施設内	
23	ヒト神経芽腫Kan+Ts	GT10	LE392	本施設内	
24	ヒト気管平滑筋	GT10	LE392	本施設内	
25	ヒト気管平滑筋	GT10	LE392	本施設内	
26	ヒト胸腺	GT10	LE392	C1	HL1127a
27	ヒト脾臓5' ストレッチ	GT11	LE392	C1	HL1134b
28	ヒト末梢血単球	GT10	LE392	C1	HL1050a
29	ヒト精巣	GT10	LE392	C1	HL1065a
30	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	HL1065a
31	ヒト黒質	GT10	LE392	C1	HL1093a
32	ヒト胎盤 #11	GT11	LE392	C1	HL1075b
33	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	カスタム
34	ヒト胎盤 #59	GT10	LE392	C1	HL5014a
35	ヒト下垂体	GT10	LE392	C1	HL1097a
36	ヒト膝 #63	UniZapXR	XL1-Blue MRF [*]	St	937208
37	ヒト胎盤 #19	GT11	LE392	C1	HL1008
38	ヒト肝臓5' ストレッチ	GT11	LE392	C1	HL1115b
39	ヒト子宮	Zap-CMVXR	XL1-Blue MRF [*]	St	980207
40	ヒト腎ラージインサー トcDNAライブラリー	TriplEx2	XL1-Blue	C1	HL5507u

10

20

30

40

* : Stratagene

** : Clontech

【 0 0 9 5 】

50

表II：INSP002クローニングプライマー

プライマー	配列 (5' - 3')
INSP002-CP1	CTC AGC CAT ACG CCT CCG AA
INSP002-CP2	GCT GAG CTG CCA GTG AGA CA
INSP002V-5' -F	ACC TGG AAG GAA GCG ACT GCA CTG A
INSP002V-5' -R	GCA GCC GGG CCG GGA GAG AAC GAA GGG CAC AGC CTT A
INSP002V-3' -F	AGG CTG TGC CCT TCG TTC TCT CCC GGC CCG GCT GCT C
INSP002V-3' -R	ACT CCA GGA CGG GCA CTG TGT CTA C
INSP002V-5' nest-F	GTC GAC TGC TAG TGA CCT TGA G
INSP002V-3' nest-R	ACA TCA TCC AGG TCC ACG TCT T

10

【0096】

表III：IPSN002サブクローニングおよびシーケンシングのためのプライマー

プライマー	配列 (5' - 3')
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
M13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
pEAK12-F	GCC AGC TTG GCA CTT GAT GT
pEAK12-R	GAT GGA GGT GGA CGT GTC AG
INSP002V-EX1	AA GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u> ATG CTC CTT GGC CAG CTA TC
INSP002V-EX2	(GTG ATG GTG ATG GTG) TGC TTT TGG GCT GCA GTG AC
GCPフォワード	G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC <u>GCC ACC</u>
GCPリバーズ	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT "TCA" (ATG GTG ATG GTG ATG GTG)

20

下線付き配列 = コザック配列

" " 付き配列 = 終止コドン

() 内配列 = Hisタグ

30

【0097】

表IV：完全長INSP002のクローニングのためのPCRプライマー

プライマー	配列 (5' - 3')
INSP002-FL-F	GAT GCT CCT TGG CCA GCT AT
INSP002-FL-R	CCA TCC ACG ATG CTC AGT TC

【0098】

(配列表)

注記：エクソン - エクソン連結部によってコードされるアミノ酸については、より5'側のエクソンに割り当てられるであろう。

40

配列番号：1 (INSP002 - ヌクレオチド配列エクソン1)

1 AAATGCCTCC CAGGCTATCC AGGAGGGGCC AAGAGATTAA AAGCAGGTTC
 51 AGAAGGCTCA GATGCCACTC ACCAGACAGC AGGGTCGACT GCTAGTGACC
 101 TTGAGCCAG TCCGACAGA CAGACAGGCA GACAGACGCA CGGACAAGCA
 151 GATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCACTCTTCT GTGCCTGCTT AGCGGGGCCC
 201 TGCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCCTCG ACCTCAGTCC
 251 TGGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGGCTCTG GGCCAGGGG CCCTGCCCCC
 301 ACTGGTGCCA GCTTCTGCCC TTGGGAGCTG GAAGGCCTTC TTGGGCTGCTG
 351 AGAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGGCAGGC TGCAGCGTGG GCAAGACGAG

50

401 GTGGCTGCTG TGA CTCTGCC GCTGAACCCT CAGGAAGTGA TCCAGGGGAT
 451 GTGTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAG

配列番号：2 (INSP002 - タンパク質配列エクソン1)

1 MLLGQLSTLL CLLSGALPTG SGRPEPQSPR PQSWAAANQT WALGPGALPP
 51 LVPASALGSW KAFLGLQKAR QLGMGRLQRG QDEVAAVTLP LNPQEVIQGM
 101 CKAVPFVQ

配列番号：3 (INSP002 - ヌクレオチド配列エクソン2)

1 GTGTTCTCCC GGCCCGGCTG CTCAGCCATA CGCCTCCGAA ATCATCTGTG
 51 CTTTGGTCAT TGCTCCTCTC TCTACATCCC TGGCTCGGAC CCCACCCAC
 101 TAGTCCTGTG CAACAGCTGT ATGCCTGCTC GCAAGCGTTG GGCACCCGTG
 151 GTCCTGTGGT GTCTCACTGG CAGCTCAGCC TCCCGTCGAC GGGTGAAGAT
 201 ATCCACCATG CTGATCGAGG GGTGTCCTG CAGCCCAAAA GCATGA

10

【 0 0 9 9 】

配列番号：4 (INSP002 - タンパク質配列エクソン2)

1 VF SRPGCSAI RLRNHLCFGH CSSLYIPGSD PTPLVLCNSC MPARKRWAPV
 51 VLWCLTGSSA SRRRVKISTM LIEGCHCSPK A

配列番号：5 (INSP002 - ヌクレオチド配列)

20

1 AAATGCCTCC CAGGCTATCC AGGAGGGGCC AAGAGATTAA AAGCAGGTTG
 51 AGAAGGCTCA GATGCCACTC ACCAGACAGC AGGGTCGACT GCTAGTGACC
 101 TTGAGCCCAG TCCGGACAGA CAGACAGGCA GACAGACGCA CGGACAAGCA
 151 GATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCACTCTTCT GTGCCTGCTT AGCGGGGCCC
 201 TGCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCCTCG ACCTCAGTCC
 251 TGGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGGCTCTG GGCCAGGGG CCCTGCCCCC
 301 ACTGGTGCCA GCTTCTGCCC TTGGGAGCTG GAAGGCCTTC TTGGGCCTGC
 351 AGAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGGCAGGC TGCAGCGTGG GCAAGACGAG
 401 GTGGCTGCTG TGA CTCTGCC GCTGAACCCT CAGGAAGTGA TCCAGGGGAT
 451 GTGTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAGGTGTT CTCCCGGCCG GGCTGCTCAG
 501 CCATACGCCT CCGAAATCAT CTGTGCTTTG GTCATTGCTC CTCTCTCTAC
 551 ATCCCTGGCT CGGACCCAC CCCACTAGTC CTGTGCAACA GCTGTATGCC
 601 TGCTCGCAAG CGTTGGGCAC CCGTGGTCCT GTGGTGTCTC ACTGGCAGCT
 651 CAGCCTCCC TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT CGAGGGGTGT
 701 CACTGCAGCC CAAAAGCATG A

30

配列番号：6 (INSP002 - タンパク質配列)

1 MLLGQLSTLL CLLSGALPTG SGRPEPQSPR PQSWAAANQT WALGPGALPP
 51 LVPASALGSW KAFLGLQKAR QLGMGRLQRG QDEVAAVTLP LNPQEVIQGM
 101 CKAVPFVQVF SRPGCSAIRL RNHLCFGHCS SLYIPGSDPT PLVLCNSCMP
 151 ARKRWAPVVL WCLTGSSASR RRVKISTMLI EGCHCSPKA

40

【 0 1 0 0 】

配列番号：7 (INSP002 - シグナルペプチドをもたないタンパク質配列エクソン1)

1 RPEPQSPRPQ SWAAANQTWA LGPGALPPLV PASALGSWKA FLGLQKARQL
 51 GMGRLQRGQD EVAAVTLPLN PQEVIQGMCK AVPFVQ

配列番号：8 (INSP002 - シグナルペプチドをもたないタンパク質配列)

1 RPEPQSPRPQ SWAAANQTWA LGPGALPPLV PASALGSWKA FLGLQKARQL
 51 GMGRLQRGQD EVAAVTLPLN PQEVIQGMCK AVPFVQVFSR PGCSAIRLRN
 101 HLCFGHCSSL YIPGSDPTPL VLCNSCMPAR KRWAPVVLWC LTGSSASRRR

50

151 VKISTMLIEG CHCSPKA

配列番号：9 (シグナルペプチドをもたない INSP002タンパク質配列-成熟 INSP002ポリペプチド-をコードするヌクレオチド配列)

1 AGGCCTGAAC CCCAGTCTCC TCGACCTCAG TCCTGGGCTG CAGCCAATCA GACCTGGGCT
 61 CTGGGCCCAG GGGCCCTGCC CCCACTGGTG CCAGCTTCTG CCCTTGGGAG CTGGAAGGCC
 121 TTCTTGGGCC TGCAGAAAGC CAGGCAGCTG GGGATGGGCA GGCTGCAGCG TGGGCAAGAC
 181 GAGGTGGCTG CTGTGACTCT GCCGCTGAAC CCTCAGGAAG TGATCCAGGG GATGTGTAAG
 241 GCTGTGCCCT TCGTTCAGGT GTTCTCCCGG CCCGGCTGCT CAGCCATACG CCTCCGAAAT
 301 CATCTGTGCT TTGGTCATTG CTCCTCTCTC TACATCCCTG GCTCGGACCC CACCCCACTA
 361 GTCCTGTGCA ACAGCTGTAT GCCTGCTCGC AAGCGTTGGG CACCCGTGGT CCTGTGGTGT
 421 CTCACTGGCA GCTCAGCCTC CCGTCGACGG GTGAAGATAT CCACCATGCT GATCGAGGGG
 461 TGTCACCTGCA GCCCAAAAGC ATGA

10

【0101】

配列番号：10 (シグナルペプチドをもたない INSP002エクソン1タンパク質-成熟 INSP002エクソン1ポリペプチド-をコードするヌクレオチド配列)

1 AGGCCTGAAC CCCAGTCTCC TCGACCTCAG TCCTGGGCTG CAGCCAATCA GACCTGGGCT
 61 CTGGGCCCAG GGGCCCTGCC CCCACTGGTG CCAGCTTCTG CCCTTGGGAG CTGGAAGGCC
 121 TTCTTGGGCC TGCAGAAAGC CAGGCAGCTG GGGATGGGCA GGCTGCAGCG TGGGCAAGAC
 181 GAGGTGGCTG CTGTGACTCT GCCGCTGAAC CCTCAGGAAG TGATCCAGGG GATGTGTAAG
 241 GCTGTGCCCT TCGTTCAG

20

配列番号：11 (5'非翻訳領域をもたない INSP002タンパク質をコードするヌクレオチド配列)

1 ATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCACTCTTCT GTGCCTGCTT AGCGGGGCCCT
 51 GCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCCTCG ACCTCAGTCCT
 101 GGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGGCTCTG GGCCAGGGG CCCTGCCCCCA
 151 CTGGTGCCA GCTTCTGCCC TTGGGAGCTG GAAGGCCTTC TTGGGCCTGCA
 201 GAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGGCAGGC TGCAGCGTGG GCAAGACGAGG
 251 TGGCTGCTG TGA CTCTGCCC GCTGAACCCT CAGGAAGTGA TCCAGGGGATG
 301 TGTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAGGTGTT CTCCCGGCCG GGCTGCTCAGC
 351 CATA CGCCT CCGAAATCAT CTGTGCTTTG GTCATTGCTC CTCTCTCTACA
 401 TCCCTGGCT CGGACCCAC CCCACTAGTC CTGTGCAACA GCTGTATGCCT
 451 GCTCGCAAG CGTTGGGCAC CCGTGGTCCT GTGGTGTCTC ACTGGCAGCTC
 501 AGCCTCCCG TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT CGAGGGGTGTC
 551 ACTGCAGCC CAAAAGCATG A

30

配列番号：12 (5'非翻訳領域をもたない INSP002エクソン1タンパク質をコードするヌクレオチド配列)

1 ATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCACTCTTCT GTGCCTGCTT AGCGGGGCCCT
 51 GCCTACAGG CTCAGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCCTCG ACCTCAGTCCT
 101 GGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGGCTCTG GGCCAGGGG CCCTGCCCCCA
 151 CTGGTGCCA GCTTCTGCCC TTGGGAGCTG GAAGGCCTTC TTGGGCCTGCA
 201 GAAAGCCAG GCAGCTGGGG ATGGGCAGGC TGCAGCGTGG GCAAGACGAGG
 251 TGGCTGCTG TGA CTCTGCCC GCTGAACCCT CAGGAAGTGA TCCAGGGGATG
 301 TGTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAG

40

【0102】

配列番号：13 (変種 INSP002ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列)

1 GTCGACTGCT AGTGACCTTG AGCCCAGTCC GGACAGACAG ACAGGCAGAC AGACGCACGG
 61 ACAAGCAGAT GTCCTTGGC CAGCTATCCA CTCTTCTGTG CCTGCTTAGC GGGGCCCTGC

50

121 CTACAGGCTC AGGGAGGCCT GAACCCAGT CTCCTCGACC TCAGTCCTGG GCTGCAGCCA
 181 ATCAGACCTG GGCTCTGGGC CCAGGGGCC TGCCCCACT GGTGCCAGCT TCTGCCCTTG
 241 GGAGCTGGAA GGCCTTCTTG GGCCTGCAGA AAGCCAGGCA GCTGGGGATG GGCAGGCTGC
 301 AGCGTGGGCA AGACGAGGTG GCTGCTGTGA CTCTGCCGCT GAACCCTCAG GAAGTGATCC
 361 AGGGGATGTG TAAGGCTGTG CCCTTCGTTT TCTCCCGGCC CGGCTGCTCA GCCATACGCC
 421 TCCGAAATCA TCTGTGCTTT GGTCATTGCT CCTCTCTCTA CATCCCTGGC TCGGACCCCA
 481 CCCCCTAGT CCTGTGCAAC AGCTGTATGC CTGCTCGCAA GCGTTGGGCA CCCGTGGTCC
 541 TGTGGTGTCT CACTGGCAGC TCAGCCTCCC GTCGACGGGT GAAGATATCC ACCATGCTGA
 601 TCGAGGGGTG TCACTGCAGC CAAAAGCAT GAACTGAGCA TCTGGATGGG TGCACGGAGA
 661 CACGCACCTT GGAGAAATGA GGGGAGATGG ACCAAGAAAG ACGTGGACCT GGATGATGT

10

配列番号：14 (変種 INSP002ポリペプチド)

1 MLLGQLSTLL CLLSGALPTG SGRPEPQSPR PQSWAAANQT WALGPGALPP LVPASALGSW
 61 KAFLGLQKAR QLGMRLQRG QDEVAAVTLP LNPQEVIIQM CKAVPFVLSR PGCSAIRLRN
 121 HLCFGHCSSL YIPGSDPTPL VLCNSCMPTLR KRWAPVVLWC LTGSSASRRR VKISTMLIEG
 161 CHCSPKA

配列番号：15 (5'非翻訳領域をもたない変種 INSP002ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列)

1 ATGCTCCTTG GCCAGCTATC CACTCTTCTG TGCCTGCTTA GCGGGGCCCT GCCTACAGGC
 61 TCAGGGAGGC CTGAACCCCA GTCTCCTCGA CCTCAGTCCT GGGCTGCAGC CAATCAGACC
 121 TGGGCTCTGG GCCCAGGGGC CCTGCCCCCA CTGGTGCCAG CTTCTGCCCT TGGGAGCTGG
 181 AAGGCCTTCT TGGGCCTGCA GAAAGCCAGG CAGCTGGGGA TGGGCAGGCT GCAGCGTGGG
 241 CAAGACGAGG TGGCTGCTGT GACTCTGCCG CTGAACCCTC AGGAAGTGAT CCAGGGGATG
 301 TGTAAGGCTG TGCCCTTCGT TCTCTCCCGG CCCGGCTGCT CAGCCATACG CCTCCGAAAT
 361 CATCTGTGCT TTGGTCATTG CTCCTCTCTC TACATCCCTG GCTCGGACCC CACCCCACTA
 421 GTCCTGTGCA ACAGCTGTAT GCCTGCTCGC AAGCGTTGGG CACCCGTGGT CCTGTGGTGT
 481 CTCCTGTGCA GCTCAGCCTC CCGTCGACGG GTGAAGATAT CCACCATGCT GATCGAGGGG
 541 TGCTACTGCA GCCCAAAAGC A

20

【図面の簡単な説明】

30

【0103】

【図1】配列番号：2および4を組合せたポリペプチド配列を用いた、NCBI非重複的データベースに対するBLASTの結果を示す。

【図2】配列番号：2および4を組合せたポリペプチド配列と最近縁配列であるホモサピエンズケルペロス関連1タンパク質との間のBLASTによって得られたアラインメントを示す。

【図3】2002年11月26日に実施した、NCBI-nrおよびNCBI-ntデータベースにおけるINSP002に対するBLASTヒットの上位4つを示す。

【図4】INSP002のAK095926.1とのアラインメントを示す。

【図5】INSP002のIMAGE：4558384とのアラインメントを示す。

40

【図6】INSP002ヌクレオチド配列を、その翻訳とともに示す。

【図7】INSP002の部分的クローン化配列を、その翻訳とともに示す。

【図8】pCRII-TOPO-INSP002 partialのマッピングを示す。

【図9】INSP002の予測配列(上段)と部分的クローニング配列(下段)のアラインメントを示す。

【図10】IMAGE：4558384のcDNAインサートのヌクレオチド配列および翻訳を示す。

【図11】INSP002の予測配列(上段)とIMAGE：4558384(BC025333.1)(下段)とのアラインメントを示す。

【図12】Image4558384からPCRによって作製されたINSP002Vのヌクレオチド配列および翻訳を示す。

50

- 【図 1 3】 pCR4blunt-TOPO-INSP002Vのマップを示す。
- 【図 1 4】 INSP002予測配列（上段）とINSP002V変種配列（下段）との比較を示す。
- 【図 1 5】 発現ベクター-pEAK12dのマップを示す。
- 【図 1 6】 ゲートウェイベクター-pDONR201のマップを示す。
- 【図 1 7】 pEAK12d-INSP002-V-6HISのマップを示す。
- 【図 1 8】 心臓からクローニングされた完全長INSP002の配列を示す。
- 【図 1 9】 心臓からクローニングされた完全長INSP002をコードするプラスミドpCR4-blunt TOPO-INSP002FLのマップを示す。

【 図 1 】

図 1 : NCBI 非重複的データベースにおける INSP002 に対する BLAST ヒットの上位 10 個

```

Query= INSP002
      (189 letters)

Database: ncbi-nt
      1,021,646 sequences: 4,527,726,597 total letters

Searching.....done

                                Score   E
Sequences producing significant alignments:      (bits) Value

gi|15217064|gb|AF400435.1|AF400435 Homo sapiens cerberus-related... 59 2e-10
gi|11427432|ref|XM_005320.1| Homo sapiens cerberus 1 (Xenopus laevis) 69 2e-10
gi|4885134|ref|NM_005454.1| Homo sapiens cerberus 1 (Xenopus laevis) 69 2e-10
gi|5802091|gb|AF139721.1|AF139721 Gallus gallus cerberus homolog... 68 3e-10
gi|5902633|gb|AF179484.1|AF179484 Gallus gallus caronte (CAR) mRNA... 67 5e-10
gi|2853615|gb|AF035579.1|AF035579 Mus musculus cerberus homolog ... 61 5e-08
gi|6753409|ref|NM_009887.1| Mus musculus cerberus 1 homolog (Xenopus laevis) 61 5e-08
gi|2654026|gb|AF031896.1|AF031896 Mus musculus cerberus-related ... 61 5e-08
gi|1513087|gb|U64831.1|XLU64831 Xenopus laevis head-inducing fac... 57 9e-07
gi|6679017|ref|NM_008675.1| Mus musculus neuroblastoma, suppressor... 55 3e-06

```

【 図 2 】

図 2: トップヒット, ホモサピエンスケルベロス関連 1 とのアラインメント

```

>gi|15217064|gb|AF400435.1|AF400435 Homo sapiens cerberus-related 1
      (CER1) mRNA, complete cds
      Length = 804

Score = 68.9 bits (167), Expect = 2e-10
Identities = 36/102 (35%), Positives = 53/102 (51%)
Frame = +1

Query: 87  VTLPLNPQEVIQMCKAVFVQVFSRPGCSAIRLRNLHLCFGHCSSLYIPGSDPTPLVLCN 146
          V LQ+  EV  C+ VPF Q + GC + ++NLQFG C S++ PG+  C+
Sbjct: 442  VILPIKSHZVHWZCRVTFVFSQTIITHEGCEKVVVQNLCPGKCGSVHFPGAACHSHITCS 621

Query: 147  SCMPARKRWAPVVLWCLTGSASRRVKISTMLIEGCHCSFK 188
          C+PA+  + L C  SS  +K+  ML+E C C K
Sbjct: 622  HCLPAKFTTMHLPINCTELSSV----IKV-VMLVEEQCKVK 732

```

【 図 3 】

図 3: NCBI-nr 及び NCBI-nt データベースにおける INSP002 に対する BLAST ヒットの上位 4 つ

i) ncbi-nr

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+... 1,242,768 sequences; 395,571,179 total letters
Searching.....done
Sequences producing significant alignments:
ref|NP_689867.1| hypothetical protein FLJ38607 [Homo sapiens] >g... 394 e-109
ref|XP_113990.1| hypothetical protein XP_113990 [Homo sapiens] ... 221 5e-57
ref|XP_164458.1| similar to hypothetical protein FLJ38607 [Homo ... 70 1e-11
ref|NW_009449.1| cerberus 1; cerberus-related 1; cerberus 1 [Xen... 69 3e-11
gb|AA051610.1|AF139721.1 cerberus homolog [Gallus gallus] 68 6e-11

ii) ncbi-nt

Database: All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
1,469,831 sequences; 7,238,625,236 total letters
Searching.....done
Sequences producing significant alignments:
ref|NM_152654.1| Homo sapiens hypothetical protein FLJ38607 [FLJ... 394 e-108
dbj|AK095926.1| Homo sapiens cDNA FLJ38607 fis, clone HEART2004941 394 e-108
gb|BC025333.1| Homo sapiens, clone IMAGE:4558384, mRNA, partial cds 221 e-103
ref|XM_113990.1| Homo sapiens LOC199699 (LOC199699), mRNA 221 e-103
gb|AC092069.2| Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-423F1, compl... 222 1e-56

【 図 4 】

図 4: INSP002 の AK095926.1 とのアラインメント

>dbj|AK095926.1| Homo sapiens cDNA FLJ38607 fis, clone HEART2004941
Length = 1731
Score = 394 bits (1013), Expect = e-108
Identities = 189/189 (100%), Positives = 189/189 (100%)
Frame = +2
Query: 1 MLLGQLSTLLCLLGGALPTGSGRPEPQSRPQSWAAANQTWALGPGALPFLVPASALGSW 60
MLLGQLSTLLCLLGGALPTGSGRPEPQSRPQSWAAANQTWALGPGALPFLVPASALGSW
Sbjct: 44 MLLGQLSTLLCLLGGALPTGSGRPEPQSRPQSWAAANQTWALGPGALPFLVPASALGSW 223
Query: 61 KAFLLGQKARQLGMRLLQRGGDEVAAVTLPLNPFQEVIGMCKAVFVQVFERPCCSAIRL 129
KAFLLGQKARQLGMRLLQRGGDEVAAVTLPLNPFQEVIGMCKAVFVQVFERPCCSAIRL
Sbjct: 224 KAFLLGQKARQLGMRLLQRGGDEVAAVTLPLNPFQEVIGMCKAVFVQVFERPCCSAIRL 403
Query: 121 RNHLGFCGHCSSLYIFGSDPTFLVLCNSMFKARKKAPVPLVLCITGSSASRRVKIETMLI 180
RNHLGFCGHCSSLYIFGSDPTFLVLCNSMFKARKKAPVPLVLCITGSSASRRVKIETMLI
Sbjct: 404 RNHLGFCGHCSSLYIFGSDPTFLVLCNSMFKARKKAPVPLVLCITGSSASRRVKIETMLI 583
Query: 181 EGCHCSFKA 189
EGCHCSFKA
Sbjct: 584 EGCHCSFKA 610

【 図 5 】

図 5: INSP002 の IMAGE: 4558384 とのアラインメント

>gb|BC025333.1| Homo sapiens, clone IMAGE:4558384, mRNA, partial cds
Length = 1746
Score = 221 bits (562), Expect (2) = e-103
Identities = 108/108 (100%), Positives = 108/108 (100%)
Frame = +1
Query: 1 MLLGQLSTLLCLLGGALPTGSGRPEPQSRPQSWAAANQTWALGPGALPFLVPASALGSW 60
MLLGQLSTLLCLLGGALPTGSGRPEPQSRPQSWAAANQTWALGPGALPFLVPASALGSW
Sbjct: 187 MLLGQLSTLLCLLGGALPTGSGRPEPQSRPQSWAAANQTWALGPGALPFLVPASALGSW 366
Query: 61 KAFLLGQKARQLGMRLLQRGGDEVAAVTLPLNPFQEVIGMCKAVFVQ 108
KAFLLGQKARQLGMRLLQRGGDEVAAVTLPLNPFQEVIGMCKAVFVQ
Sbjct: 367 KAFLLGQKARQLGMRLLQRGGDEVAAVTLPLNPFQEVIGMCKAVFVQ 510
Score = 178 bits (451), Expect (2) = e-103
Identities = 81/81 (100%), Positives = 81/81 (100%)
Frame = +2
Query: 109 VFSRFGCSAIRLNRHLGFCGHCSSLYIFGSDPTFLVLCNSMFKARKKAPVPLVLCITGSSA 168
VFSRFGCSAIRLNRHLGFCGHCSSLYIFGSDPTFLVLCNSMFKARKKAPVPLVLCITGSSA
Sbjct: 596 VFSRFGCSAIRLNRHLGFCGHCSSLYIFGSDPTFLVLCNSMFKARKKAPVPLVLCITGSSA 775
Query: 169 SRRRVKISTMLIEGCHCSFKA 189
SRRRVKISTMLIEGCHCSFKA
Sbjct: 776 SRRRVKISTMLIEGCHCSFKA 638

【 図 6 】

図 6: INSP002 のヌクレオチド配列 (翻訳付き)

1 AAATGCCTCC CAGGCTATCC AGGAGGGGCC AAGAGATTAA AAGCAGGTTT AGAAGGGCTCA
61 GATGCCACTC ACCAGACAGC AGGGTCGACT GCTAGTGACC TTGAGCCGAC TCCGGACAGCA
121 CAGACAGGCA GACAGACGCA CGCAGACAGCA GATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCATCTCTCT
m l l g q l s t l
181 GTCCCTGCTT AGCGGGGCC TGCCTACAGC CTCAGGAGG CCTGAACCCC ASTCTCCCTG
l c l l s g a l p t g s g r p e p q s p
241 ACCTCAGTCC TGGGCTGCAG CCAATCAGAC CTGGGCTCTG GGCCAGGGCC CCCTGCCCCC
r p q s w a a a n q t w a l g p g a l p
301 ACTGGTGCCA GCTTCTGCC TTGGGAGCTG GAAGGCCTTC TTGGGCTGCG AGAAGCCAG
p l v p a s a l g s w k a f l g l q k a
361 GCAGCTGGG ATGGGAGGCG TGCAGCGTGG GCAAGCAGG GTGGCTGCTG TGACTCTGCC
r q l g m g r l q r g q d e v a a v t l
421 GCTGAACCC CAGGAAGTGA TCCAGGGGAT GTGTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAGTGTGT
p l n p q e v i q g m c k a v p f v q v
481 CTCGGGCCC GGCTGCTCAG CCATACGCCT CCGAATCAT CTGTGCTTTG GTCATCTGCT
f s r p g c s r l f n h l c f g h c
INSPO02-CP1
541 CTCTCTATC ATCCCTGGCT CGGACCCACC CCACTAGTC CTGTGGAACA GCTSTATGCC
s s l y i p g s d p t p l v l c n s c m
601 TGCTCGCAAG CGTTGGGCAC CCGTGGTCTT GTGGTGTCTC ACTGGCAGCT CAGCCTCCGG
p a r k r w a p v v l w c l t g s s a s
INSPO02-CP2
661 TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT CGAGGGGTGT CACTGCAGCC CAAAAGCATG
r r r v k i s t m l i e g c h c s p k a
721 AACTGAGCAT CGTGGATGGG TGCACGGAGA CAGCACCTT GGAGAAATGA GGGGAGAT

【 図 7 】

図 7: INSP002 の部分的クローン化配列 (翻訳付き)

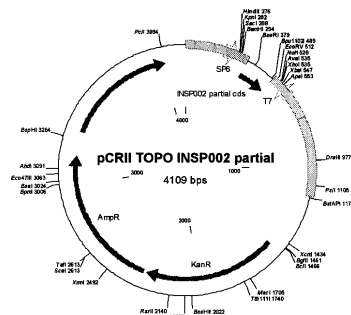
1 CTCAGCGATA CGCCTCCGAA ATCATCTGTG CTTTGGTCAT TGCTCCCTCT TCTACATCCC
s a i r l r n n h l c f g h c s s l y i
61 TGGCCTGGAC CCCACCCACC TAGTCTCTGT CAACAGCTGT ATGCCTGCTC GCAAGCGTTG
p g s d p t p l v l c n s c m p a r k r
121 GGCACCCGCT GTCTCTGGT GTCTCACTGG CAGCTCAGC
w a p v v l w c l t g s s

【 図 8 】

図 8: pCRII-TOPO-INSP002 partial のマップ

分子: 産物 1, 4109 bps DNA 環状
ファイル名: ~7879480.cm5
説明: pCRII-TOPO-open への NoName のライゲーション
分子の特徴:

Table with 5 columns: 型, 開始, 終了, 名称, 説明. Rows include markers like LacZa, SP6, INSP002 partial cds, C T7, fl ori, KanR, AmpR, and pUC ori.



【 図 9 】

図 9: INSP002 の部分的クローン化配列 (翻訳付き)

1 CTCAGCGATA CGCCTCCGAA ATCATCTGTG CTTTGGTCAT TGCTCCCTCT TCTACATCCC
s a i r l r n n h l c f g h c s s l y i
61 TGGCCTGGAC CCCACCCACC TAGTCTCTGT CAACAGCTGT ATGCCTGCTC GCAAGCGTTG
p g s d p t p l v l c n s c m p a r k r
121 GGCACCCGCT GTCTCTGGT GTCTCACTGG CAGCTCAGC
w a p v v l w c l t g s s

【 図 9 - 1 】

図 9: INSP002 の予測配列(上段)と部分的クローン化配列(下段)とのアラインメント

図 9a: スクレオチド配列のアラインメント

```

INSPr 10 20 30 40 50 60
CAGAAATGCTCCAGGCTATCCAGAGGCGCAAGAGATPAAAGCAGTTICAGAAAGC
Serono -----
INSPr 70 80 90 100 110 120
TCAGATGCGCTCCACAGAGCGAGGCTGAGCTGGTAGTGCCTTACGGCCACTGGGAGC
Serono -----
INSPr 130 140 150 160 170 180
AGACAGACAGGCGACAGAGCCACGAGCAGCAGAGTCTCTCTTGGCAGCTATCCACTCT
Serono -----
INSPr 190 200 210 220 230 240
TCTGTGCTCTTACGCGGGCCCTGCTACAGGCTCAGAGAGAGCTCAACCCAGCTCTCC
Serono -----
INSPr 250 260 270 280 290 300
TCAGCTCACTCTTGGGCTTCCAGCCATCAGACTTGGGCTCTTGGCCAGGGCCCTGCTC
Serono -----
INSPr 310 320 330 340 350 360
CCACTGCTCCAGCTCTCTGCTTGGGAGCTGAGAGGCTCTTGGGCTTGCAGAAAGC
Serono -----
INSPr 370 380 390 400 410 420
CAGGCTGCTGGGATGGGAGCTTCCAGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCTTGGGCT
Serono -----
INSPr 430 440 450 460 470 480
GCCGCTCAACCTCAGGAAGTGTCCAGGAGTGTATAGGCTGTCCCTTGGTTCAGGAT
Serono -----
INSPr 490 500 510 520 530 540
CTTCTCCGCGCCGCTGCTCAGCCATACGGCTCCGAAATCATCTGTCTTCTGCTATTC
Serono -----
INSPr 550 560 570 580 590 600
CTCCTCTCTTACATCCCTGGCTCGAGCCCAACCCCACTAGTCTGTGCAACAGCTGAT
Serono -----
INSPr 610 620 630 640 650 660
GCTGCTCGAAGGCTTGGGACCCCTGGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
Serono -----

```

【 図 9 - 2 】

```

INSPr 670 680 690 700 710 720
CCGTGGACGGGTGAAGATATCCACCATGCTGATCGAGGGGTGTCACTGCAGCCAAAAGC
Serono -----

```

図 9b: タンパク質配列のアラインメント:

```

Serono -----SAIRL
INSPr 10 20 30 40 50 60
MLLGLQLSTLLCLLSSALPTGSRPEPQPRPQSWAANQWALSGALPLVPAALGSW
Serono -----
INSPr 70 80 90 100 110 120
KAFLLGLKARQLGMRLLRGGQDEVAAVTLPLNPEVIGMCKAVFVQVFRPFCSAIRL
Serono -----
INSPr 130 140 150 160 170 180
RNHLCPHCSSLYIFGSDFTFLVLCNSMPARKRWAFVWLWLTGSSA-----
INSPr 190 200 210 220 230 240
RNHLCPHCSSLYIFGSDFTFLVLCNSMPARKRWAFVWLWLTGSSASRRRVKISTMLI
Serono -----
INSPr 250 260 270 280 290 300
EGCHCSFKFA

```

【 図 10 - 1 】

図 10: Image:4558384 における cDNA インサートのスクレオチド配列とその翻訳

```

1 CGGCACGAGG GGGGAGCTTG GAAGGAAGCC ACTGCACTGA TCCAGAAATG CCTCCCAGGC
INSPr 5'-F
61 TATCCAGGAG GGGCCAAAGAG ATTAAAAGCA GGTTCAGAA GCTCAGATGC CACTCACCAG
121 ACAGCAGGGT CGACTGCTAG TGACCTTGA G CCCAGTCCG ACAGACAGAC AGGCAGACAG
INSPr 5'-nest-F
181 ACGCACGGAC AAGCAGATGC TCCTTGGCCA GCTATCCA CTCTGTGCTC TGCTTAGCGG
m l l g q l s t l l c l l s
241 GGCCTGCTC ACAGCTCAG GAGGGCTTGA ACCCGACTG CCTCGACCTC AGTCCTGGGC
g a l p t g s g r p e p q s p r p q s w
301 TGACGCCAAT CAGACTTGG CTCTGGGCCC AGGGCCCTG CCCCCTGG TGCCAGCTTC
a a n q t w a l g p g a l p l v p a
361 TGCCCTTGGG AGCTGGAAG CCTTCTTGG CCTGCAAAA GCCAGGCAGC TGGGAGTGGG
s a l g s w k a f l g l q k a r q l g m
421 CAGGCTGCA CGTGGGCAAG ACGAGTGGC TGCTGTGACT CTGCGCTGA ACCCTCAGGA
g r l q r g q d e v a a v t l p l n p q
481 AGTGATCCAG GGGATGTGT AGGCTGTGCC CTTCGTTCAG ACACGGGAGT CTGGGTATGT
e v i q g m c k a v p f v q t r e s r y
INSPr 5'-R
541 TGGCCAGCT AGTCTTGGC TTCTGGGCTC AAGCAATCT CCGACTCAG CTTCCTGAGT
v a q a s l e l l a s s n p t s a s
601 TCTAGTGTG TCTCCGGCCC GGTGCTCAG CCATACGCT CCGAAATCAT CTGTGCTTTG
INSPr 5'-F
661 GTCAATGCTC CTCTCTTAC ATCCCTGGCT CGGACCCAC CCCACTAGT CTGTGCAACA
721 GCTGTATGCC TGCTCGCAAG CGTTGGGCAC CGGTGTCTCT GTGGTCTCTC ACTGGCAGCT
781 CAGCCTCCCG TCGACGGGTG AAGATATCCA CCAATGCTGAT CGAGGGGTGT CACTGCAAGC
841 CAAAAGCATG AACTGAGCAT CTGGATGGST GCACGGAGAC ACGCACCTTG GAGAAATGAG
901 GGGAGATGGA CCAAGAAAGA CGTGGACCTG GATGATGTAC TCTGGGTCAA GAGACCAGGG
INSPr 5'-nest-R
961 ATGCAGGGTT AGGCAGACAG GTCCCCAGAG TCCTCACCT GCTCCCCAGA CAGTAGACAC
1021 AGTCCCCCTC CTGAGTTGC ACCACTGATA GTCACAGCA ACAAATGATT ACAACTCATT
INSPr 5'-R
1081 TTTTTTTTTT TTTTGGAGAT GGAGTCTGCT TCTGTGCCC AGGCTGGAGT GCAGTGGCCG
1141 AATCTCAGCT CACTGCAAG TCCACCTCCC GGGTTTATGC CATTCTCTCT TCTCAGCCCTC
1201 CCGAGTAGCT GGGACTACAG GCACCCGCCA ACACGCCCGG STAATTTTTT GTATTTTTAG
1261 TAAAGACAGG GTTCCACCTG GTTAGCCAG ATGGTCTCTA TCTCCTGACC TCGTGATCTG
1321 CTTGCTTGG CCTTATTTT TTTTTTTTAA GGACAGAGTC TCTCTCTGTC ACCCAGGCTG
1381 GAGTCAATG CGCGGATCTT GGCTCACTGT AACTTCCACT TGCCAGGCTC AAGCAGTCTT

```

【 図 10 - 2 】

```

1441 CCTGCCTCAG CTTCTGAGT AGCTGGGACT ACAGGCACCC GCCACCATGC CCAGCTAATT
1501 TTTGTATTTT TAGTAGAGAC AGAGTTTTC CATATTAGCC TGGTGGTCT CAACTCTCTG
1561 GCCTCAGGTG ATCTGCCAC CTCGGCCCTC CAAAGTCTG GATCAAATC CACTGTTAAT
1621 CATTAGGCTG AACTGTCTCT TATAGATGA GGTCAAAGAC ACTCCCACTT GCAGGGAGGG
1681 TAGATGGCCC CACCCAGACC GAGAGACACA GTGATGACCT CAGCCTAGGG ACMCCAAAAA
1741 AAAAAAAAAA AAAAAA

```

INSP002 予測配列と比較して、87 bp のインサートの位置はハイライト表示されている。

3' 非コード配列における Alu 配列は、イタリック体表記されている。

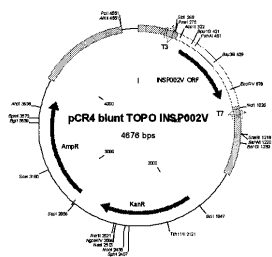
【 図 1 3 】

図 13: pCR4blunt-TOPO-INSP002V のマップ

分子: pCR4 blunt TOPO INSP002V, 4676 bps DNA 環状
ファイル名: pCR4 blunt TOPO INSP002V.cm5
説明: pCR4blunt-TOPO への INSP002 nestFR 産物のライゲーション
注記: プラスミド ID 13075

分子の特徴:

Table with 5 columns: 型, 開始, 終了, 名称, 説明. Lists various genetic elements like lac promoter, M13 ribosome binding site, LacZa-ccdB, polylinker, TOPO cloning site, INSP002V PCR product, LacZa-ccdB fusion, polylinker, TOPO cloning site, M13 forward priming site, KanR, AmpR, and pUC origin.



【 図 1 4 - 1 】

図 14: INSP002 予測配列 (上段) と INSP002V 変種配列 (下段) との間の比較

図 14a: スクレオチド配列

Sequence alignment comparing INSP002 (INSPr) and INSP002V (INSPen) nucleotide sequences. Shows differences in the 100-110 and 160-170 regions.

【 図 1 4 - 2 】

Sequence alignment comparing INSP002 (INSPr) and INSP002V (INSPen) amino acid sequences. Shows differences in the 230-240 and 280-290 regions.

【 図 1 4 - 3 】

図 14b: タンパク質配列

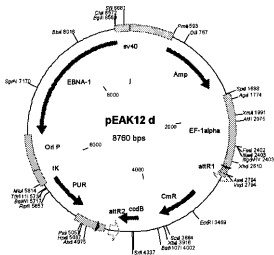
Comparison of INSP002 and INSP002V protein sequences. Shows differences in the 230-240 and 280-290 amino acid positions.

【 図 1 5 】

図 15: 発現ベクター pEAK12d のマップ

分子: pEAK12 d, 8760 bps DNA 環状
 ファイル名: pEAK12DEST.cm5
 説明: 哺乳動物細胞発現ベクター(プラスミド ID 11345)
 分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	Amp	
領域	1690	2795	EF-1 α	
領域	2703	2722		pEAK12F プライマーの位置
領域	2796	2845		MCS
マーカー	2855		attR1	
遺伝子	3256	3915	CmR	
遺伝子	4257	4562	ccdB	
マーカー	4603		C attR2	
領域	4733	4733		MCS
領域	4734	5162		ポリ A/スプライシング
領域	4819	4848	C	pEAK12R プライマーの位置
遺伝子	5781	5163	C PUR	ピュロマイシン
領域	6005	5782	C tK	tK プロモーター
領域	6500	6006	C Ori P	
遺伝子	8552	6500	C EBNA-1	
領域	8553	8752	sv40	

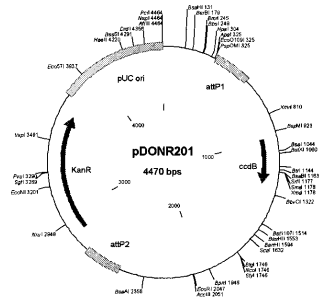


【 図 1 6 】

図 16: ゲートウェイ pDONR201 のマップ

分子: pDONR201, 4470 bps DNA 環状
 ファイル名: pDONR201.cm5
 説明: ゲートウェイ適合性ベクター(Invitrogen) - プラスミド ID# 13309
 分子の特徴:

型	開始	終了	名称
領域	332	563	attP1
遺伝子	959	1264	ccdB
領域	2513	2744	attP2
遺伝子	2868	3677	KanR
領域	3794	4467	pUC ori



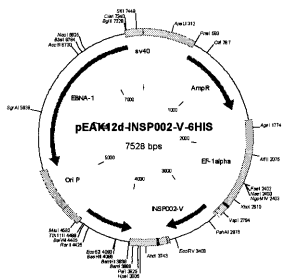
【 図 1 7 】

図 17: pEAK12d-INSP002-V-6HIS のマップ

分子: pEAK12d-INSP002-V-6HIS, 7528 bps DNA 環状
 ファイル名: pEAK12d-INSP002V-6HIS.cm5
 説明: cDNA は, attR1 部位と attR2 部位との間に挿入されている。
 注記: プラスミド ID 13227

分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
領域	2	595		pmb-ori
遺伝子	596	1519	AmpR	
領域	1690	2795	EF-1 α	プロモーター
領域	2703	2722		pEAK12F
領域	2796	2845		MCS''
領域	2855	2874		attB1
遺伝子	2888	3469	INSP002-V	
領域	3474	3495		attB2
領域	3501	3501		'MCS
領域	3502	3930		ポリ A/スプライシング
領域	3616	3597	C	pEAK12R
遺伝子	4549	3931	C	ピュロマイシン R
領域	4773	4550	C	tK プロモーター
領域	5268	4774	C Ori P	
領域	7320	5268	C EBNA-1	
領域	7321	7520	sv40	



【 図 1 8 】

図 18: ヒト心臓 cDNA からクローニングした完全長 INSP002

```

1  GATGCTCCTT GGCCAGCTAT CCACTCTTCT GTGCGTGCTT AGCGGGGGCC TGCCACAGG
   m l l g q i s t l l c l l s g a l p t
   INSP002-FL-F
61  CTCAGGGGAGG CCTGAACCCC AGTCTCCTCG ACCTCAGTCC TGGGCTGCAG CCAATCAGAC
   g s g r p e p q s p r p q s w a a a n q
121 CTGGGCTCTG GGCCAGGGG CCCTGCCCCC ACTGGTGCCA GCTTCTGCC TTGGGAGCTG
   t w a l g p g a l p p l v p a s a l g s
181 GAAGCCCTTC TTGGGCTGCG AGAAGCCAG GCAGCTGGG ATGGGAGGC TGCAGCGTGG
   w k a f l g l q k a r q l g m g r l q r
241 GCAAGACGAG GTGGTGCTG TGACTCTGCC GCTGAACCT CAGGAAGTGA TCCAGGGGAT
   g q d e v a a v t l p l n p q e v i q g
301 GTGTAAGGCT GTGCCCTTCG TTCAGGTGTT CTCGCCGGCC GGCTGCTCAG CCATACGCCT
   m c k a v p f v q v f s r p g c s a i r
361 CCGAAATCAT CTGTGCTTTG GTCATTGCTC CTCTCTCTAC ATCCCTGGCT CGGACCCAC
   l r n h l c f g h c s s l y i p g s d p
421 CCCACTAGTC CTGTGCAACA GCTGTATGCC TGCTCGCAAG CGTTGGGCAC CCGTGGTCTT
   t p l v l c n s c m p a r k r w a p v v
481 GTGGTGTCTC ACTGGCAGCT CAGCCTCCCG TCGACGGGTG AAGATATCCA CCATGCTGAT
   l w c l t g s s a s r r r v k i s t m l
541 CGAGGGGTGT CACTGCAGCC CAAAAGCATG AACTGAGCAT CGTGGATGG
   i e g c h c s p k a
   INSP002-FL-R

```

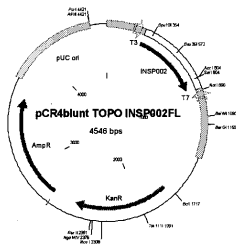
【 図 19 】

図 19: pCR4blunt-TOPO-INSPO02FL のマップ

分子: pCR4blunt TOPO INSP002FL, 4546 bps DNA 環状
 ファイル名: pCR4 blunt TOPO INSP002 FL.cm5,
 説明: pCR4Blunt-TOPO open*へのNoNameのライゲーション

分子の特徴:

型	開始	終了	名称	説明
領域	2	216		lac プロモーター領域
領域	205	221		M13 リバースプライミング部位
領域	217	294		LacZa-ccdB 遺伝子融合
マーカー	243		T3	
領域	262	294		ポリリンカー
領域	294	294		TOPO クローニング部位
領域	295	883		INSP002-F3R3 PCR 産物
遺伝子	296	865	INSP002	INSP002 ORF
領域	884	1399		'LacZa-ccdB 遺伝子融合
領域	884	901		ポリリンカー
領域	884	884		'TOPO クローニング部位
マーカー	936		C T7	T7 プロモーター
領域	959	944	C	-20M13 フォワードプライミング部位
遺伝子	1748	2542	KanR	カナマイシン耐性遺伝子 ORF
領域	2734	2738		リボソーム結合部位
遺伝子	2746	3606	AmpR	アンピシリン耐性遺伝子 ORF
領域	3751	4424	pUC ori	pUC 由来



【 配列表 】

[2005528336000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB 02/05865
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/52 C12N15/19 C12N5/10 C12Q1/68 C07K16/28 G01N33/566 A61K38/19		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBL, EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ, 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	BOUWMEESTER T ET AL: "CERBERUS IS A HEAD-INDUCING SECRETED FACTOR EXPRESSED IN THE ANTERIOR ENDODERM OF SPEMANN'S ORGANIZER", NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, VOL. 382, PAGE(S) 595-601 XPO02066227 ISSN: 0028-0836 page 595, right-hand column, paragraph 2; figure 1	1-7, 18, 22-30, 32-35, 37-47
X	DATABASE EMBL 'Online! STRAUSBERG ET AL.: "Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 4558384 5', mRNA sequence." Database accession no. BG330085 XPO02245164 the whole document	8, 9, 14-16
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the International search		Date of mailing of the international search report
23 June 2003		04/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, TX. 51 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Seroz, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/05865

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EIMON PETER M ET AL: "Xenopus Dan, a member of the Dan gene family of BMP antagonists, is expressed in derivatives of the cranial and trunk neural crest." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 107, no. 1-2, September 2001 (2001-09), pages 187-189, XP002245163 ISSN: 0925-4773</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/05865

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. Claims Nos.: 17, 19-21
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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/GB 02 05865

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 37-39 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.

Although claims 23-31, 40 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.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 17, 19-21

Present claims 17, 19-21 relate to a compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the inhibition or the increase of the activity of the claimed peptide.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application doesn't provide support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/compound/method/apparatus by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search impossible. Consequently, the search has not been carried out for claims 17, 19-21.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 14/52	C 0 7 K 14/52	Z N A
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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 デイヴィーズ マーク ダグラス

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

(72) 発明者 フェルプス クリストファー ベンジャミン

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

(72) 発明者 ファガン リチャード ジョセフ

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

(72) 発明者 パワー クリスチン

フランス エフ - 0 1 7 1 0 トワリ リュ デ ジョンキーユ 1 0

(72) 発明者 ヨルク メラニー

スイス ツェーハー - 1 2 3 2 コンフィニョン シェマン ド ヴイヨネックス 2 0 アー

(72) 発明者 イベルソン マルク

スイス ツェーハー - 1 1 8 8 ギメル シェマン プラネット 4

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA21 CA01 GA11 HA12

4B063 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ43 QQ79 QQ91 QQ96 QR08 QR32

QR42 QR48 QR55 QR62 QR82 QS25 QS33 QS34 QX01

4B065 AA90Y AB01 AC15 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 BA01 BA08 BA23 BA44 DA01 NA14 ZA011 ZA361 ZB081

ZB111 ZB261 ZB351 ZC211

4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA01 EA28 EA31 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005528336A5	公开(公告)日	2006-02-16
申请号	JP2003556441	申请日	2002-12-20
[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	デイヴィーズマークダグラス フェルプスクリストファーベンジャミン ファガンリチャードジョセフ パワークリスチン ヨルクメラニー イベルソンマルク		
发明人	デイヴィーズ マーク ダグラス フェルプス クリストファー ベンジャミン ファガン リチャード ジョセフ パワー クリスチン ヨルク メラニー イベルソン マルク		
IPC分类号	A61K38/00 A01K67/027 A61P3/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/52 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09 C12N5/10		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P3/00 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/52		
FI分类号	A61K37/02 A01K67/027 A61P3/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/52.ZNA C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC15 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA361 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZB351 4C084/ZC211 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	2001030738 2001-12-21 GB		
其他公开文献	JP2005528336A		

摘要(译)

本发明涉及一种新颖的蛋白质 (INSP002) , 在本文中被鉴定为是一种胱氨酸-结折叠细胞因子超家族的Dan家族成员的分泌蛋白质, 并且涉及该蛋白质和来自编码基因的核酸序列的用途。 诊断, 预防和治疗疾病。

