

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 503024

(P2003 - 503024A)

(43)公表日 平成15年1月28日(2003.1.28)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/47	2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 2 4
16/18		16/46	4 B 0 6 3
16/46		19/00	4 B 0 6 4
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 56数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 505689(P2001 - 505689)

(86)(22)出願日 平成12年6月14日(2000.6.14)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月25日(2001.12.25)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/05457

(87)国際公開番号 W000/078947

(87)国際公開日 平成12年12月28日(2000.12.28)

(31)優先権主張番号 99112024.7

(32)優先日 平成11年6月22日(1999.6.22)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 メルク パテント ゲゼルシャフト ミツト
ベシュレンクテル ハフトング
MERCK PATENT GESEL
LSCHAFT MIT BESCHR
AENKTER HAFTUNG
ドイツ連邦共和国 デー - 64293 ダルムシ
ユタット フランクフルター シュトラ
ーセ 250

(72)発明者 デン ダース、 イツァーク
ドイツ連邦共和国 デー - 64407 フレーン
キッシュ - クルムバッハ シュラーシュ
トラーセ 76

(74)代理人 弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 頭部外傷誘導性細胞質カルシウム結合蛋白質

(57)【要約】

ANIC - BPポリペプチドおよびポリヌクレオチド、
ならびにかかるポリペプチドを組換え技術によって生産
する方法が開示される。また、ANIC - BPポリペプ
チドおよびポリヌクレオチドを診断アッセイにおいて使
用する方法も開示される。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

(a) 配列番号：1の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされる単離ポリペプチド；

(b) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなる単離ポリペプチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有する単離ポリペプチド； および

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列、 ならびに

(e) (a)～(d)の該ポリペプチドの断片ならびに変異体とからなる群の1つから選択される単離ポリペプチド。

【請求項2】 配列番号：2のポリペプチド配列を含んでなる、請求項1に記載の単離ポリペプチド。

【請求項3】 配列番号：2のポリペプチド配列である、請求項1に記載の単離ポリペプチド。

【請求項4】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなる単離ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%の同一性を有する単離ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：2のポリペプチド配列に少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド；

(e) 少なくとも15個のヌクレオチドを有し、配列番号：1の配列またはその断片を有する標識プローブを用いて、ライブラリーを厳格なハイブリダイゼーション条件下でスクリーニングすることによって取得される、少なくとも100

塩基のヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド；

(f) (a) ~ (e) のポリヌクレオチドのRNA等価物であるポリヌクレオチド；

あるいは、前記単離ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド配列、

ならびに、その全長にわたって、上述のポリヌクレオチドの変異体ならびに断片である、あるいは上述のポリヌクレオチドと相補的であるかのポリヌクレオチド

とからなる群の1つから選択される単離ポリヌクレオチド。

【請求項5】

(a) 配列番号：1のポリヌクレオチドを含んでなる単離ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：1の単離ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離ポリヌクレオチド； ならびに

(d) 配列番号：2のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドとからなる群より選択される、請求項4に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項6】 かかる発現ベクターが適合性宿主細胞内に存在する際、請求項1のポリペプチドの産生が可能であるポリヌクレオチドを含んでなる発現システム。

【請求項7】 請求項1のポリペプチドを発現している、請求項6に記載の発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞またはその膜。

【請求項8】 請求項1のポリペプチドを生産する方法であって、請求項7に記載の宿主細胞を前記ポリペプチドの産生に十分な条件下で培養し、そして、培地から該ポリペプチドを回収する工程を含む方法。

【請求項9】 免疫グロブリンFc領域と、請求項1のポリペプチドのいずれか1つとから成る融合蛋白質。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか一項のポリペプチドに対する、免疫特異的な抗体。

【請求項11】 請求項1のポリペプチドの機能または濃度を、促進または

阻害する化合物を特定するためのスクリーニング法であって、

(a) 該ポリペプチド(または、該ポリペプチドを発現している細胞または膜)あるいは、その融合蛋白質に対する、候補化合物の結合を、直接的または間接的に該候補化合物と付随される標識によって、定量的または定性的に、測定あるいは検出すること；

(b) 標識された競合物質の存在下で、該ポリペプチド(または、該ポリペプチドを発現している細胞または膜)あるいは、その融合蛋白質に対する、候補化合物の結合の競合を測定すること；

(c) 該ポリペプチドを発現している細胞または細胞膜に適する検出システムを用いて、該ポリペプチドの活性化または阻害により生成されるシグナルを、該候補化合物が引き起こすか否かを試験すること；

(d) 候補化合物と、請求項1に記載のポリペプチドを含む溶液とを混合して、混合物を作り、
該混合物中における、該ポリペプチドの活性を測定し、そして、該混合物の活性を、該候補化合物を含んでいない対照混合物と比較すること； あるいは

(e) 細胞内における、前記ポリペプチドをコードするmRNAあるいは前記ポリペプチドの産生に対する、候補化合物の影響を、例えば、ELISAアッセイを用いて検出すること；

とからなる群より選択される一つの方法、

および

(f) バイオテクノロジーまたは化学的な常法に従って、前記化合物を製造することとを含んでなるスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、ヒト - 急性神経誘導性カルシウム結合蛋白質 (ANIC - BP) ならびに、対応しており、この蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞ならびに抗体をも提供する。加えて、本発明は、該蛋白質の生産方法、ならびに、該蛋白質の発現と関連する病気の治療または予防法を提供する。本発明はまた、かかるポリヌクレオチドならびにポリペプチドの作用の阻害または活性化にも関する。

【0002】**(発明の背景)**

卒中や急性頭部外傷、多発性硬化症ならびに脊髄損傷は、今までのところ適用可能な治療がない疾患である。卒中は、死亡原因の中で第三番目であり、患者ならびに社会システムへの負担は、ばく大である。卒中の大半を占める、虚血性卒中の場合、脳内における血管の遮断が、最初の事象である。頭部外傷性発作は、西洋諸国においては、若年層の有力な疾患である。機械的衝撃および動脈破裂が原因となる出血性卒中に罹患する患者数ははるかに少ない。認可された医薬品は、ほとんど利用できないということが、共通した特徴である。現在利用可能な治療手段は、限局性脳虚血に関する実験的研究から引き出された、病態生理学的な着想に基づいている。これらは、動脈再疎通、炎症性プロセスの阻害、および神経の保護を目的とする薬理学的手法を含んでいる。動脈再灌流の手法を用いた、さらなる研究は、その途上にある。多形核白血球依存性の内皮付着受容体アンタゴニストを用いた、初期の臨床試験は完了しつつあるが、手法は依然として、創出しなければならない。しかしながら、虚血カスケード中の単一の段階だけを対象とする、いずれの手法も、限られた利益を生み出すのみである。したがって、将来の治療は、組合せ療法を基礎とすることが最も適するものであろう。低用量アセチルサリチル酸 (ASA) と徐放出型のジピリダモールとの組合せは、卒中の再発防止における付加剤となることが明らかにされている (Tijssen et al., Int. J. Clin. Pract., suppl.91, 14-16, 1997)。現在、臨床評価が計画

されている、もう1つの組合せは、t P Aに有効な神経保護作用剤を加えたものである。しかし、これらの試験の結果は、極めて効果的と言うにはほど遠いものである。したがって、急性の神経損傷症状および多発性硬化症などの疾患を患っている患者の治療のための、新しい医薬を開発する、ならびに、より広範に有用な治療法を確立する上で利用可能な、医薬対象を提供するために、病態生理学的なメカニズムに関して、さらに知識を深めることがさし迫って必要となっている。

【0003】

神経保護における、 Ca^{2+} -結合蛋白質の役割に対するかなりの証拠があがっているので、本発明は、 Ca^{2+} -結合蛋白質に焦点を当てている。カルシウム結合蛋白質(CaBP)の正確な機能は、完全には知られていないものの、CaBPは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の緩衝作用を有すると提唱されている。 Ca^{2+} の過負荷は、蛋白質分解およびミトコンドリアの機能不全を引き起こす、生化学的プロセスを活性化するため、CaBPのこの緩衝能は、被刺激毒性の神経損傷に対する保護作用を有する可能性がある(Heizmann et al., TINS, 15, 259-64, 1992)。 Ca^{2+} レベル調節および神経保護における、この提唱されているCaBPの役割を裏付ける様々な証拠が存在している。

【0004】

中枢神経系で発現される、主な Ca^{2+} -結合蛋白質類(CaBP)(パルプアルブミン、カルビンジン-D28K、およびカルレチニン)は、様々なニューロン群において、非常に特異的でかつ選択的な発現パターンを有している。CaBPを発現しているニューロンの中で、少数のニューロンは1つを超える主なカルシウム結合蛋白質を発現するが、ほとんどは1つの型だけを発現している。特定の細胞型におけるCaBPの有無が、選択的な易損性として知られる現象の基礎となっていることに関して、証拠が集まりつつある。選択的易損性は、特定の種類の中枢神経系(CNS)損傷に反応して、特定の型のニューロンが死滅するという特性である。例えば、CA1海馬ニューロンは、全体の虚血に対して選択的に易損性であり、小脳プルキンエ細胞は、頭部外傷、卒中、および胎児のアルコール曝露に対して選択的に易損性であり、黒質中のニューロンは、パーキンソン

病に対して易損性である。選択的なニューロンの易損性と、様々なCaBPの発現パターンとの関連付けを行う努力がなされており、ある研究者らは、高レベルのCaBPが、傷害に対して選択的に易損性であるニューロン群で見出されると報告し、一方、他の者らは、傷害に対して選択的に抵抗性のニューロン群における高レベルのCaBPを報告している。例えば、高レベルのアルブミンを発現するニューロンは、AMPA誘導性毒性に対して選択的に易損性であると報告されている(Weiss et al., *Neurol.*, 40, 1288-1292, 1990)が、高レベルのカルビンジン-D28Kを発現している培養された海馬ニューロンは、グルタミン酸誘導性毒性に対して選択的に抵抗性であると報告されている(Baimbridge et al., *TINS*, 15, 303-8, 1992)。同様に、高レベルのカルレチニンを発現している海馬ニューロンは、興奮毒であるグルタミン酸塩、NMDA、カイニン酸塩、およびキスカル酸の毒性用量に対して耐性である(Winsky et al., *Novel Calcium-Binding Proteins*, 277-300, 1991)。

【0005】

CaBPはまた、様々なCNS疾患状態において変化する発現を示すことが明らかにされているが、しかし、また、CaBPの発現は、傷害に対する選択的易損性に関係するか、または選択的耐性に関係するかに関して、結果は一致していない。カルビンジン-D28Kを発現しているニューロンは、アルツハイマー病(Iacopino et al., *PNAS*, 87, 4078-82, 1990, Hof et al., *Exp. Neurol.*, 111, 293-301, 1991)およびハンチントン病(Kiyama et al., *Brain Res.*, 526, 303-07, 1990)の際、選択的易損性であると報告されているが、黒質中のカルビンジン-D28K発現性のニューロンは、パーキンソン病の際も、選択的易損性ではない(Yamada et al., *Brain Res.*, 526, 303-07, 1990)。全体虚血のアレチネズミ・モデルでは、特定の海馬細胞種においては、アルブミンの存在は、生存と正の関連性を示すことが明らかにされている(Tortosa et al., *Neurosci.*, 1, 33-43, 1993)が、別の研究ではアルブミンを発現する海馬介在ニューロンは、アルツハイマー病の際に、選択的易損性であることが示唆された(Brady et al., *Neurosci.*, 80, 1113-25, 1997)。

【0006】

カルビンジン遺伝子のノックアウトマウスは、これらのニューロンは形態上は正常に見えるという事実にも関わらず、このCaBPを通常は発現するニューロン（例えば、小脳プルキンエ細胞）における重度の機能不全を示唆する、機能欠損（例えば、運動失調）を示す。この知見は、CaBPが細胞活性パターンに非常に重要であることが示唆される（Airaksinen et al., PNAS, 94, 1488-93, 1997）。加えて、カルビンジン-D28kを具えた運動ニューロンのレトロウイルス感染は、筋萎縮性側索硬化症患者由来のIgGにより誘導される毒性に対して神経保護作用を有することが明らかにされており（Ho et al., PNAS, 93, 6796-801, 1996）、また、カルビンジン-D28kのトランスフェクションは、血清の取りやめ、グルタミン酸曝露、および神経毒MPP+に因る毒性からPC12細胞を保護することが示されている（McMahon et al., Molec. Brain Res., 526, 303-07, 1998）。

【0007】

結論として、神経変性におけるカルシウム結合蛋白質の役割に関して、無視できない情報がある。あるCaBPは、保護作用を示し、また、別のものは、選択的易損性の原因となることは確かであるものの、異なるニューロン群の間において、特定のCaBPの発現が、かかるCaBPの異なる機能的反応を引き起こすか否かは、未だに不明である。もう1つの知見は、異なる種類のCNS損傷の重症度が、CaBPの見かけ上の神経保護効果に影響を及ぼす可能性があるということである。すなわち、あるCaBPは、軽度損傷を含む損傷モデルでは抵抗性を与えるが、しかし、より重度のCNS損傷では、Ca²⁺の増加を緩衝することができない可能性もある。したがって、CaBPがCNS損傷プロセスにおいて抵抗性ならびに易損性を与えるという、考慮すべき証拠があるが、しかし、この関連の機構ならびに反応の調節は、今後解明しなければならない。

【0008】

機能的に未同定の遺伝子（MO25）を含む遺伝子ファミリーが、マウス由来のcDNAライブラリから最近単離された（Miyamoto et al., Mol. Reprod. Dev., 34, 1-7, 1993）。このライブラリは、マウス早期胚から単離されたR

NAから構築された。Mo25の予想されるアミノ酸配列から、MO25遺伝子はCa²⁺結合蛋白質と構造上の相同性を有し、膜貫通ドメインが欠失していることが判明し、この蛋白質は未受精卵の細胞質ゾルの発達に關与している可能性を示唆している。しかし、この蛋白質の本当の機能は不明のままである。もう1つのMo25様遺伝子が、ショウジョウバエのcDNAライブラリからクローニングされている(Nozaki et al., DNA Cell Biol., 15, 505-09, 1996)。かかるMo25 cDNAの推定アミノ酸配列は、マウスのMo25 相同体と69.3%の相同性を有していた。サッカロミセス - セレビジエにおける相同体は、カルシニューリン Bサブユニット遺伝子近傍のオープン・リーディング・フレームにコードされていた。最近、もう1つの遺伝子が、アスペルギルス h y m A変異株から単離され(Karos et al., Mol. Gen Genet., 260, 510-521, 1999)、酵母、植物、ハエ、蠕虫、魚、マウスおよびヒトにおける相同体に対応していることが判明した。H y m 蛋白質の細胞内での機能は、前述のいかなる生物においても明らかにされていない。機能的寄与が部分的にしか理解されていない他の多くの蛋白質と同じく、薬物発見プロセスは、現在、「機能ゲノミクス」、すなわち、ハイスループットのゲノムまたは遺伝子に基づく生物学を包含することで、根本的な変革を経つつある。治療標的となる、遺伝子および遺伝子産物を同定する手段としてのこの手法は、「ポジショナル・クローニング」に基づく初期の手法を、急速に取って代わりつつある。生物学的な機能または遺伝疾患である、表現型が同定され、次いで、これは、その遺伝子マップ上の位置に基づいて、その原因となる遺伝子を捜し出すことになる。

【0009】

機能ゲノミクスは、ハイスループットDNA配列決定技術、ならびに、現在利用可能な多くの分子生物学データベースから潜在的な関心のある遺伝子配列を見分けるための、様々な生物情報科学的なツールに大きく依存している。医薬の発見における標的として、さらなる遺伝子およびその対応するポリペプチド/蛋白質を見極め、特性を明らかにすることが、引き続き必要である。

【0010】

(発明の概要)

本発明は、ANIC-BP、特に、ANIC-BPポリペプチドおよびANIC-BPポリヌクレオチド、その組換え物ならびにそれらの生産方法に関する。かかるポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、卒中および急性頭部外傷、多発性硬化症ならびに脊髄損傷を含んでいる、ただし、それに限定されることはない、以後「本発明にかかる疾患」と称する、特定の疾患の治療法に関連して、興味を持たれる。さらなる形態において、本発明は、本発明によって提供される材料を用いて、アゴニストならびにアンタゴニスト（例えば、阻害剤）を同定する方法、また、同定された化合物により、ANIC-BPの不均衡に付随する状態を治療する方法に関する。さらに別の形態において、本発明は、不適正なANIC-BPの活性または濃度と関連している疾患を検出するための診断アッセイに関する。

【0011】

（発明の説明）

第1の形態において、本発明は、ANIC-BPポリペプチドに関する。

【0012】

かかるポリペプチドは、

- （a） 配列番号：1の配列を含んでなるポリヌクレオチドによってコードされる単離ポリペプチド；
- （b） 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド配列を含んでなる単離ポリペプチド；
- （c） 配列番号：2のポリペプチド配列を含んでなる単離ポリペプチド；
- （d） 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する単離ポリペプチド；
- （e） 配列番号；2のポリペプチド配列； ならびに
- （f） 配列番号：2のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98、または0.99の同一性指数を有するポリペプチド配列を有するか、あるいは含んでなる単離ポリペプチド；
- （g） （a）～（f）のポリペプチドの断片および変異体を含んでいる。

【0013】

本発明のポリペプチドは、カルシウム結合蛋白質ファミリーのポリペプチドの構成員であると考えられる。したがって、これらは、新規な医薬標的として役立つことができるので、重要である。

【0014】

該ANIC-BPの生物学的性質は、以後「ANIC-BPの生物活性」または「ANIC-BP活性」と呼ぶ。本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのANIC-BPの生物活性を示すことが好ましい。

【0015】

本発明のポリペプチドはまた、すべての対立形質の形態ならびにスプライス変異体を含む、前述のポリペプチドの変異体も含んでいる。かかるポリペプチドは、基準のポリペプチドから、挿入、欠失、ならびに、保存的または非保存的などちらでもよい置換、あるいは、その任意の組合せによって、変異されている。特に好ましい変異体は、いくつかの、例えば、50から30、30から20、20から10、10から5、5から3、3から2、2から1、あるいは1つのアミノ酸が、任意な組合せで、挿入、置換、または欠失されたものである。

【0016】

本発明のポリペプチドの好ましい断片は、配列番号：2のアミノ酸配列から、少なくとも、連続する、30、50もしくは100個のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含んでなる単離ポリペプチド、あるいは、配列番号：2のアミノ酸配列から、少なくとも、連続する、30、50または100個のアミノ酸を末端から除去、もしくは欠失されたアミノ酸配列を含んでなる単離ポリペプチドを含んでいる。好ましい断片は、ANIC-BPの生物活性を仲介する、生物学的に活性な断片であり、同様の活性もしくは改善された活性を有するか、あるいは、望ましくない活性が減少したものを含んでいる。また、動物、特にヒトにおいて、抗原性または免疫原性である断片も好ましい。

【0017】

本発明のポリペプチドの断片は、ペプチド合成によって、対応する完全長ポリペプチドを製造するために使用することもできる。したがって、これらの変異体

は、本発明の完全長ポリペプチドを生産するための中間体として使用することができる。本発明のポリペプチドは、「成熟」蛋白質の形態でもよく、あるいは、前駆体または融合蛋白質のような、より大きな蛋白質の一部とすることができる。分泌またはリーダー配列、プロ配列、精製に利用される配列、例えば、マルチ・ヒスチジン残基、あるいは、組換え生産中の安定化のための付加的な配列を含む、付加的なアミノ酸配列をも含むと、しばしば有利となる。

【0018】

本発明のポリペプチドは、例えば、天然の原料から、発現システムを内に含む遺伝子操作された宿主細胞からの単離（下記を参照）、あるいは、例えば、自動ペプチド合成機を用いた、化学合成、または、かかる方法の組合せなど、いずれかの適合するやり方により調製することができる。かかるポリペプチドの調製手段は、当技術分野において、よく理解されている。

【0019】

さらなる形態において、本発明は、ANIC-BPのポリヌクレオチドに関する。かかるポリヌクレオチドは、

- (a) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなる単離ポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号：1のポリヌクレオチドを含んでなる単離ポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号：1のポリヌクレオチドに対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する単離ポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号：1の単離ポリヌクレオチド；
- (e) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離ポリヌクレオチド；
- (f) 配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる単離ポリヌクレオチド；
- (g) 配列番号：2のポリペプチド配列に対して、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードす

るポリヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド；

(h) 配列番号：2のポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(i) 配列番号：1のポリヌクレオチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98、または0.99の同一性指数を有するポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなる単離ポリヌクレオチド；

(j) 配列番号：2のポリペプチド配列と比較して、0.95、0.96、0.97、0.98、または0.99の同一性指数を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するか、または含んでなる単離ポリヌクレオチド；

ならびに、前述のポリヌクレオチドの断片もしくは変異体である。ないしは、その全長にわたり、前述のポリヌクレオチドと相補的であるかのポリヌクレオチドとを含んでいる。

【0020】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい断片は、配列番号：1の配列から、連続する、少なくとも15、30、50もしくは100個の塩基を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離ポリヌクレオチド、あるいは、配列番号：1の配列から、連続する、少なくとも30、50または100個の塩基が末端から除去された、もしくは欠失された配列を含んでなる単離ポリヌクレオチドを含む。

【0021】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体は、スプライス変異体、対立形質型変異体、ならびに、1つまたは複数の単一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドをも含む、多型をも含んでいる。

【0022】

本発明のポリヌクレオチドはまた、配列番号：2のアミノ酸配列を含んでなり、また、その内の、いくつかの、例えば、50から30、30から20、20から10、10から5、5から3、3から2、2から1、または1つのアミノ酸残基が、任意な組合せで、置換、欠失、または付加されている、ポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドも含む。

【0023】

さらなる形態において、本発明は、本発明のDNA配列のRNA転写産物であるポリヌクレオチドをも提供する。したがって、

(a) 配列番号：2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写産物を含んでなる；

(b) 配列番号：2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写産物である；

(c) 配列番号：1のDNA配列のRNA転写産物を含んでなる、あるいは

(d) 配列番号：1のDNA配列のRNA転写産物である；

ならびに、それらと相補的なRNAポリヌクレオチドである、RNAポリヌクレオチドが提供される。

【0024】

配列番号：1のポリヌクレオチド配列は、Hym A (Nozaki et al., DNA cell Biol., 15, 505-09, 1996) およびMo 25 (Karas et al., Mol. Gen Genet., 260, 510-521, 1999) と相同性を示す。配列番号：1のポリヌクレオチド配列は、配列番号：2のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号：2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号：1のポリペプチドコード配列と同一であってもよく、または、遺伝コードの重複(縮重)の結果、やはり配列番号：2のポリペプチドをコードしている、配列番号：1以外の配列であってもよい。配列番号：2のポリペプチドは、Hym AおよびMo 25蛋白質と相同性および/または構造上の類似性を有する、カルシウム結合蛋白質ファミリーの他の蛋白質と関係している。

【0025】

本発明の好ましいポリペプチド、ならびにポリヌクレオチドは、とりわけ、それらの相同的なポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似の生物学的機能/性質を有していると予想される。さらには、本発明の好ましいポリペプチド、ならびにポリヌクレオチドは、少なくとも1つのANIC-BP活性を有している。

【0026】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒト中枢神経系の細胞由来mRNAのcDNAライブラリから、標準的なクローニングおよびスクリーニング技術を用いて取得

することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 参照）。本発明のポリヌクレオチドは、ゲノムDNAライブラリなどの天然原料から取得することもでき、あるいは、周知の、商業的に利用可能な技術を用いて、合成することもできる。

【0027】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え生産に用いる際、該ポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドをコードする配列、それだけを含んでいてもよく、または、リーダーまたは分泌配列、プレ、あるいは、プロもしくはプレプロ蛋白質の配列、ないしは、他の融合ペプチド部分をコードするもの等、読み枠内に、他のコード配列を伴った成熟ポリペプチドのコード配列を含んでいてもよい。例えば、融合されたポリペプチドの精製を容易にする、マーカー配列をコードすることもできる。本発明のこの形態の特定の好ましい実施態様において、マーカー配列は、pQEベクター（Qiagen, Inc.）中に提供され、Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824に記載されているような、ヘキサ・ヒスチジンペプチドであるか、またはHAタグである。該ポリヌクレオチドはまた、転写・非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニレーション・シグナル、リボソーム結合部位、ならびに、mRNAを安定化させる配列等の、非コードの5' - ならびに3' 配列を含んでいてもよい。

【0028】

配列番号：1のポリヌクレオチド配列と同一か、または十分な同一性を有しているかのポリヌクレオチドは、cDNAならびにゲノムDNAに対するハイブリダイゼーション・プローブとして、あるいは、核酸増幅反応（例えば、PCR）用のプライマーとして、用いることができる。かかるプローブおよびプライマーは、本発明のポリペプチドをコードする、完全長cDNAおよびゲノム・クローンを単離するため、ならびに、配列番号：1と高い配列類似性、典型的には少なくとも95%の相同性を有する、他の遺伝子（ヒト起源からのパラログ、ヒト以外の種に由来するオルソログおよびパラログを含む）のcDNAおよびゲノム・クローンを単離するために、用いることができる。好ましいプローブおよびプラ

イマーは、一般に、少なくとも15塩基、好ましくは少なくとも30塩基を含んでなり、少なくとも100塩基ではないにしても、少なくとも50塩基を有していてもよい。特に好ましいプローブは、30～50塩基を有することができる。特に好ましいプライマーは、20～25塩基を有することができる。

【0029】

ヒト以外の種に由来の相同体を含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、厳格なハイブリダイゼーション条件下において、好ましくは少なくとも15塩基の、配列番号：1の配列またはその断片を有する標識プローブにより、ライブラリをスクリーニングする工程と、前記ポリヌクレオチド配列を含んだ、完全長cDNAならびにゲノム・クローンを単離する工程とを含んでなる方法によって取得してもよい。かかるハイブリダイゼーション技術は、当業者には周知である。好適な、厳格なハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×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×Denhardt's 溶液、10%硫酸デキストラン、および変性し、切断したサケ精子DNA 20マイクログラム/mlを含む溶液中、42℃における終夜インキュベートと；続いて、0.1×SSC中、約65℃にてフィルターを洗浄することを含んでいる。したがって、本発明は、厳格なハイブリダイゼーション条件下において、好ましくは少なくとも15塩基の、配列番号：1の配列またはその断片を有する標識プローブにより、ライブラリをスクリーニングすることにより取得される、好ましくは少なくとも100塩基の配列を有する、単離ポリヌクレオチドも含む。

【0030】

当業者であれば、多くの場合、単離cDNA配列は不完全であり、ポリペプチドをコードする領域は、5'末端まで完全に伸びてはいないことをよく判っているであろう。これは、「反応性(processivity)」(ポリメリゼーション反応の間、酵素が鋳型と結合したままでいられる能力の尺度)が本来低い酵素である、逆転写酵素が、第1鎖のcDNA合成中に鋳型mRNAのDNA複製を完了できなかった結果である。

【0031】

完全長cDNAを得る、あるいは、短いcDNAを伸長するために、利用可能で、当業者には周知であるいくつかの方法、例えば、cDNA末端の高速増幅(RACE)法に基づくものがある(例えば、Frohman et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988 参照)。例えば、Marathon(商標)法(Clontech Laboratories Inc.)で例示される、最近の改良法は、より長いcDNAの探索を著しく単純化した。Marathon(商標)法では、選択した組織から抽出されたmRNAからcDNAを調製し、それぞれの末端に「アダプター」配列をライゲートする。次いで、遺伝子特異的な、ならびにアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて、DNAの「失われた」5'末端を増幅するため、核酸増幅(PCR)を行う。次いで、「内側の(nested)」プライマー、すなわち、増幅産物内にアニールするよう設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列のさらに3'側にアニールするアダプター特異的なプライマー、および既知の遺伝子配列のさらに5'側にアニールする遺伝子特異的なプライマー)を用いて、PCR反応を繰り返す。この反応の産物を、次いでDNA配列決定により分析し、そして、該産物を既存のcDNAに直接連結して、完全な配列とするか、あるいは、5'プライマーの設計のために、新しい配列情報を利用して、別途の完全長のPCRを実施するかにより、完全長のcDNAを構築することができる。

【0032】

本発明の組換えポリペプチドは、発現システムを内に含んでいる遺伝子操作された宿主細胞から、当技術分野において周知の方法により調製することもできる。したがって、さらなる形態において、本発明は、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含んでなる発現システム、かかる発現システムを含むように遺伝子操作された宿主細胞、ならびに組換え法による本発明のポリペプチドの生産に関する。本発明のDNA構築物に由来するRNAを用いて、かかる蛋白質を生産するために、無細胞系翻訳システムを使用することもできる。

【0033】

組換え生産のために、宿主細胞は、遺伝子操作して本発明のポリヌクレオチド用の発現システムまたはその一部を組み込むこともできる。ポリヌクレオチドは

、Davis et al. , Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrook et al. (同上) などの、多くの標準的な実験室マニュアル中に記載されている方法によって、宿主細胞に導入することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための好ましい方法には、例えば、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クション、トランスベクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質仲介トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、スクラップ・ローディング、弾道導入または感染が含まれる。

【0034】

適当な宿主の代表例には、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、ストレプトミセス、および枯草菌細胞などの細菌細胞、酵母細胞やアスペルギルス細胞などの真菌細胞、ショウジョウバエ S2 およびハスモンヨトウ Sf9 細胞などの昆虫細胞、CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293 および Bowes メラノーマ細胞などの動物細胞、ならびに植物細胞が含まれる。

【0035】

多様な発現システム、例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来の発現システム、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入因子由来、酵母染色体因子由来、バキュロウイルス、SV40 などのパポバウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルス由来のベクター、ならびに、コスミドおよびファージミドなどの、プラスミドとバクテリオファージ遺伝因子とから誘導されるもの等、それらの組合せから誘導されたベクターを、用いることができる。該発現システムは、発現を誘導すると同時に発現を調節する制御領域を含んでいてもよい。一般に、宿主におけるポリペプチドの生産のために、ポリヌクレオチドを維持、増加、あるいは発現することができる、いかなるシステムまたはベクターをも用いることができる。該適当なポリヌクレオチド配列は、例えば、上の Sambrook et al. (同上) に示されたものなどの、様々な周知の、慣用の技術のいずれかによって、発現システムに挿入することもできる。翻訳蛋白質の小胞体の内腔、ペリプラスム間隙、または細胞

外環境への分泌を可能とするため、適当な分泌シグナルを、所望のポリペプチドに組み込むこともできる。これらのシグナルは、ポリペプチドに内在的なものであってもよく、または、異種シグナルであってもよい。

【0036】

本発明のポリペプチドを、スクリーニング・アッセイで用いるために発現すべき際には、一般に、ポリペプチドは細胞表面に産生されることが好ましい。その際、細胞はスクリーニング・アッセイにおいて用いる前に、集菌してもよい。ポリペプチドが培地中に分泌される際には、ポリペプチドを回収して精製するために培地を回収することができる。細胞内で生産される際には、ポリペプチドを回収する前に、細胞を予め溶解しなければならない。

【0037】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロース・クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティ・クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィ、およびレクチン・クロマトグラフィを含む、周知の方法により、組換え細胞の培養物から回収し、精製することができる。精製のために、高性能液体クロマトグラフィを用いることが最も好ましい。該ポリペプチドが、細胞内合成、単離および/または精製の間に変性する際は、蛋白質のリフォールディングのための周知の技術を、活性な配座を再生するために用いることもできる。

【0038】

本発明のポリヌクレオチドは、関連する遺伝子における突然変異を検出することにより、診断試薬として用いることができる。cDNAまたはゲノム配列における、配列番号：1のポリヌクレオチドによって特定される遺伝子の突然変異型であって、機能不全に関連する突然変異型の検出は、該遺伝子の発現不足、発現過剰、あるいは、空間もしくは時間的に変移した発現によって起こされる疾患、または疾患に対する感受性の診断を補足する、または確定することができる診断ツールを提供することができる。該遺伝子中に突然変異を有する個人は、当技術分野で周知の様々な手法により、DNAレベルで検出されてもよい。

【0039】

診断用の核酸は、血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料などの、被検者の細胞から取得することができる。該ゲノムDNAは、直接検出のために用いることもでき、あるいは、分析前にPCR、好ましくはRT-PCR、または他の増幅技術を用いて、それを酵素的に増幅することもできる。RNAまたはcDNAも、同様の形態で用いることができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して、その増幅産物のサイズの変化により検出することができる。ポイント・ミューテーションは、増幅DNAを標識したANIC-BPヌクレオチド配列にハイブリダイズすることによって同定することができる。完全に一致した配列は、RNアーゼ消化、あるいは、または融解温度の差異により、ミスマッチした二重鎖から識別することができる。DNA配列の相違は、変性剤の有り、または無しの場合での、DNA断片の電気泳動移動度の変化により、あるいは、直接のDNA配列決定(例えば、Myers et al., Science (1985) 230: 1242 参照)により、検出することができる。特定の部位の配列変化は、RNアーゼとS1保護などの、ヌクレアーゼ保護アッセイ、あるいは、化学的切断法(Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85:4397-4401 参照)により明らかにすることができる。

【0040】

ANIC-BPポリヌクレオチド配列またはその断片を含んでなるオリゴヌクレオチド・プローブのアレイを、例えば、遺伝的突然変異の有効なスクリーニングを実施するために、構築することもできる。かかるアレイは、高密度アレイまたは格子であることが好ましい。アレイ化技術の方法は、周知であり、一般的な応用を有し、また、遺伝子発現、遺伝子連関、および遺伝変異性を含む、分子遺伝学における様々な問題に答えるために用いることができ、例えば、M. Chee et al., Science, 274, 610-613 (1996) およびその中で引用されている他の文献を参照されたい。

【0041】

ポリペプチドまたはmRNAの発現レベルの異常な上昇または低下の検出は、

被検者の本発明にかかる疾患に対する感受性を診断または決定のために用いることもできる。低下した、または上昇した発現は、例えば、核酸増幅、例えばPCR、RT-PCR、RNAアーゼ保護、ノーザンブロット法、および他のハイブリダイゼーション法などの、ポリヌクレオチド定量のための当技術分野において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。宿主由来の試料中の、本発明のポリペプチドなどの蛋白質レベルを定量するために用いることができるアッセイ技術は、当業者には周知である。かかるアッセイ法には、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタン・ブロット分析、およびELISAアッセイが含まれる。

【0042】

したがって、もう1つの形態において、本発明は、

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号：1のヌクレオチド配列、またはその断片あるいはRNA転写産物；

(b) (a)のものに相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号：2のポリペプチド、またはその断片、あるいは

(d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号：2のポリペプチドにたいする抗体を含んでなる診断キットに関する。

【0043】

かかるキットのいずれにおいても、(a)、(b)、(c)、または(d)は、実質的な構成要素を構成することができることは十分に理解されるであろう。

かかるキットは、疾患または疾患に対する感受性、特に、数ある中でも、本発明にかかる疾患の診断に際して、有用となるであろう。

【0044】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体位置分析研究用に有用である。該配列は、個々のヒト染色体上における特定の位置を、特異的に標的とし、また、ハイブリダイズすることができる。本発明に従った、染色体に対する関連する配列のマッピングは、それらの配列を遺伝子関連疾患と関係付ける際に、重要な第1段階である。いったん、配列が正確な染色体上の位置にマッピングされれば、該

配列の染色体上における物理的位置を、遺伝子マップデータと相関付けることができる。かかるデータは、例えば、V. McKusickのヒトにおけるメンデル遺伝 (Mendelian Inheritance in Man) (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能) で見ることができる。次いで、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、連鎖群分析 (物理的に隣接する遺伝子の共遺伝) を通して特定する。ゲノム配列 (遺伝子断片など) に対する正確なヒト染色体上の位置は、放射線ハイブリッド (RH) マッピング (Walter, M., Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J., and Goodfellow, P., (1994) 全ゲノムの放射線ハイブリッドマップ構築の方法 (A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes), Nature Genetics 7, 22-28) を用いて、決定することができる。いくつかのRHパネル、例えば、GeneBridge4 RHパネル (Hum. Mol. Genet. 1996 Mar; 5(3):339-46 ヒトゲノムの放射線ハイブリッドマップ (A radiation hybrid map of the human genome); Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillet D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN) は、Research Genetics (米国アラバマ州ハンツビル) から入手可能である。このパネルを用いて、遺伝子の染色体上での位置を決定するために、RH DNA上の、注目する遺伝子から設計されたプライマーを用いて、93回のPCRを実施する。これらのDNAはそれぞれ、ハムスターのバックグラウンド (ヒト/ハムスターハイブリッド セルライン) 中に維持されている、ランダムなヒトゲノム断片を含む。これらのPCRは、目的とする遺伝子のPCR産物の有無を示す93のスコアが得られる。これらのスコアを、位置が既知のゲノム配列

からのPCR産物を用いて作成されたスコアと比較する。この比較は、<http://www.genome.wi.mit.edu>で行う。

【0045】

本発明のポリヌクレオチド配列は、組織発現の研究用の有用なツールでもある。そのような研究は、それをコードしているmRNAの検出により、組織における、コードされているポリペプチドの発現パターンに関する指標を与えることができる、本発明にかかるポリヌクレオチドの発現パターンの決定を可能とする。用いる技法は、当技術分野において周知であり、cDNAマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(Schena et al., Science, 270, 467-470, 1995およびShalon et al., Genome Res., 6, 639-645, 1996)などの、格子上に配列されたクローンに対する、系内ハイブリダイゼーション法、ならびにPCRなどのヌクレオチド増幅法を含む。好ましい方法は、Perkin Elmerから入手可能なTAQMAN(商標)法を利用する。これらの研究の結果は、その生物における該ポリペプチドの正常な機能の示唆を与えることもできる。加えて、mRNAの正常な発現パターンを、同じ遺伝子の変移型(例えば、潜在的またはポリペプチドをコードする能力の変変化または調節的な突然変異を有するもの)によってコードされるRNAの発現パターンとの対比試験は、本発明のポリペプチドの役割、あるいは、疾患の際の、その不適切な発現の役割についても、有用な知見を提供することができる。かかる不適切な発現は、時間的、空間的または単に量的に特徴的であってもよい。本発明のポリペプチドは、ヒト脳において発現される。

【0046】

本発明のさらなる形態は、抗体に関する。本発明のポリペプチドもしくはその断片、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに対する、免疫特異的な抗体を作製するための、免疫原として用いることができる。「免疫特異的」なる用語は、その抗体が、先行技術における他の関連した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、実質的に高い親和性を有することを意味する。

【0047】

本発明のポリペプチドに対して創製された抗体は、該ポリペプチドまたはエピトープを含む断片、あるいは、細胞を、動物、好ましくはヒト以外の動物に、通常のプロトコルを用いて投与することにより取得することができる。モノクローナル抗体の調製のためには、セル・ラインの継代培養によって生産される抗体を提供する技法のいずれをも用いることができる。その例には、ハイブリドーマ法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495 - 497)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4: 72) およびEBVハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985) が含まれる。

【0048】

米国特許第4946778号に記載のものなどの、一本鎖抗体作製のための技法を、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を作製するために、応用することができる。同様に、トランスジェニック・マウス、または他の哺乳動物を含む他の生物を、ヒト化抗体の発現のために、利用することもできる。

【0049】

上述の抗体は、該ポリペプチドを発現するクローンの単離、または同定、あるいは、アフィニティ・クロマトグラフィによる該ポリペプチドの精製のために、使用することもできる。本発明のポリペプチドに対する抗体は、また、なかでも、本発明にかかる疾患を治療するために、使用することもできる。

【0050】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、ワクチンとしても用いることができる。したがって、さらなる形態において、本発明は、哺乳動物における免疫応答を誘導するための方法であって、その疾患がその個体内ですでに慢性化しているか否かに関わらず、前記動物を疾患から防護するため、抗体および/または、例えば、サイトカイン産生T細胞もしくは細胞毒性T細胞を含むT細胞免

疫応答を創製するのに適する、本発明のポリペプチドを該哺乳動物に接種することを含んでなる方法に関する。哺乳動物における免疫応答は、本発明にかかる疾患から前記動物を保護するために、抗体を生産するためのかかる免疫応答を誘導する目的で、*in vivo*において、該ポリペプチドをコードし、かつ該ポリヌクレオチドの発現を支配するベクターを介して、本発明のポリペプチドを送達することを含んでなる方法によって、誘起することもできる。該ベクターを投与する1つの手段は、粒子などの上へのコーティングとして、所望の細胞内へと促進することによる。かかる核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾核酸、あるいは、DNA/RNAハイブリッドから構成されてもよい。ワクチンに使用するためには、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、通常、ワクチン調合物（組成物）として提供されることになる。該調合物は、適当な担体をさらに含むことができる。ポリペプチドは胃内で分解されることもあるため、非経口（例えば、皮下、筋肉内、静脈内、または皮内注射）で投与することが好ましい。非経口投与に適した調合物は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、ならびに、調合物を受容者の血液と等張性となす溶質を含有してもよい、水性および非水性無菌注射溶液；ならびに懸濁化剤または増粘剤を含有してもよい、水性および非水性無菌懸濁液を含む。該調合物は、単位用量または多回用量容器、例えば、密閉アンプルまたはバイアル中に入れて、提供することもでき、そして、使用直前に無菌液体担体を添加するだけでよくされている、凍結乾燥状態で保存することもできる。該ワクチン調合物はまた、水中油系ならびに当技術分野で公知のその他の系などの、該調合物の免疫原性を増強するための補助剤系を含むこともできる。その用量は、ワクチンの比活性に依存しており、また、通常の実験によって容易に決定することができる。

【0051】

本発明のポリペプチドは、1つまたは複数の疾患状態、特に本明細書において前述した本発明にかかる疾患と関連する、1つまたは複数の生物学的機能を有する。したがって、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激あるいは阻害する化合物を同定することは有用である。したがって、さらなる形態において、本発明は、該ポリペプチドの機能または濃度を刺激あるいは阻害する化合物を同定するた

めの化合物をスクリーニングする方法を提供する。かかる方法は、本明細書において前述した本発明にかかる疾患などの治療および予防の目的に使用することができる、アゴニストまたはアンタゴニストを同定する。化合物は、様々な原料、例えば、細胞、細胞を含まない調製物、化学的ライブラリ、化学的化合物のコレクション、および天然産物の混合物から同定することができる。このように同定されたアゴニストまたはアンタゴニストは、場合によっては、該ポリペプチドの天然もしくは改変された基質、リガンド、受容体、酵素など；それらの構造的もしくは機能的な模倣物 (Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2): 第5章 (1991) 参照) あるいは小分子であってもよい。

【0052】

該スクリーニング法は、該ポリペプチド、または該ポリペプチドを有する細胞もしくは膜、あるいはその融合蛋白質に対する候補化合物の結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合された標識によって、単に測定してもよい。それに代えて、該スクリーニング法は、標識された競合物質 (例えばアゴニストまたはアンタゴニスト) に対抗した、候補化合物のポリペプチドへの競合的結合を、測定または (定性的または定量的に) 検出することも含まれる。さらに、これらのスクリーニング法は、該ポリペプチドを有する細胞に適した検出システムを用いて、該候補化合物が該ポリペプチドの活性化または阻害により発生するシグナルをもたらすか否かを調べてもよい。活性化の阻害物質は、一般に、既知のアゴニスト存在下でアッセイし、そして、該アゴニストによる活性化への該候補化合物の存在による影響を観察する。さらに、スクリーニング法は、混合物を作成するため、候補化合物を本発明のポリペプチドを含む溶液と混合する工程と、該混合物における、ANIC-BP活性を測定する工程と、該混合物のANIC-BP活性を候補化合物を含まない対照混合物と比較する工程とを、単に含んでもよい。

【0053】

本発明のポリペプチドは、従来の低性能スクリーニング法において、およびハイスループット・スクリーニング (HTS) フォーマットにおいても用いること

ができる。そのようなHTSフォーマットは、96穴の、より最近は、384穴マイクロタイタープレートの十分に確立された使用だけでなく、Schullick et al., Anal. Biochem., 246, 20-29, (1997)によって記載されたナノウェル法などの新たに出てきた方法も含む。

【0054】

本明細書において前述したとおり、Fc蛋白質およびANIC-BPポリペプチドから作製されたものなどの、融合蛋白質は、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストを同定するためのハイスループット・スクリーニング・アッセイのために用いることもできる(D. Bennett et al., J. Mol. Recognition, 8:52-58 (1995); および K. Johanson et al., J. Biol. Chem., 270(16):9459-9471 (1995)参照)。

【0055】

(スクリーニング手法)

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび該ポリペプチドに対する抗体は、細胞におけるmRNAおよびポリペプチドの産生に対する添加化合物の影響を検出するためのスクリーニング法を形成するために用いることもできる。例えば、当技術分野において公知の標準法により、モノクローナルならびにポリクローナル抗体を用いて、分泌された、または細胞に付随しているポリペプチドの濃度を測定するための、ELISAアッセイを構築することができる。これは、適当な操作を施された細胞または組織からの、ポリペプチドの産生を阻害または促進する物質(それぞれ、アンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる)を発見するために用いることができる。

【0056】

本発明のポリペプチドは、当技術分野において公知の標準的な受容体結合手法により、膜に結合したあるいは可溶性の受容体を、いずれであっても、同定するために用いることもできる。これらは、それらに限定されることはないものの、該ポリペプチドを、放射性同位体(例えば、 ^{125}I)によって標識、化学的に修

飾（例えば、ビオチン化）、または、検出もしくは精製に適したペプチド配列と融合し、そして、推定される受容体源（細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液）とインキュベートする、リガンド結合ならびにクロスリンク・アッセイを含む。他の方法は、表面プラズモン共鳴や分光法などの生物物理的手法を含む。これらのスクリーニング法は、該ポリペプチドのその受容体への結合と競合する、該ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを、いずれであっても、同定するために用いることもできる。かかるアッセイを実施するための標準的な方法は、当技術分野において十分に理解されている。

【0057】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体、あるいは、ある場合には、該ポリペプチドのリガンド、基質、受容体、酵素などと密接に関係しているオリゴヌクレオチドもしくは蛋白質、場合によっては、リガンド、基質、受容体、酵素などの断片；あるいは、本発明のポリペプチドと結合するが、反応を誘発しない、そのため、ポリペプチドの活性が防止される、小さな分子が含まれる。

【0058】

スクリーニング法は、トランスジェニック技術およびANIC-BP遺伝子の使用を含むこともできる。トランスジェニック動物を構築する手法は十分に確立されている。例えば、該ANIC-BP遺伝子は、受精卵母細胞の雄核へのマイクロインジェクション、移植前もしくは移植後の胚へのレトロウイルスによる導入、または電気穿孔法などにより遺伝的に改変された胚幹細胞の宿主胚盤胞への注入により、導入することができる。特に有用なトランスジェニック動物は、その動物ゲノム内で、動物の遺伝子はそのヒトの等価遺伝子で置換されている、いわゆる「ノック・イン」動物である。ノック・イン・トランスジェニック動物は、該化合物がヒト標的に対して特異的である、医薬発見プロセスにおける、標的確認のために有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、細胞内の内在性DNA配列によりコードされており、本発明のポリペプチドの該動物のオルソログの発現が、部分的または完全に失活されている、いわゆる「ノック・アウト」動物である。遺伝子のノック・アウトは、特定の細胞または組織を標的とする

こともあれば、技術上の限界の結果、特定の細胞または組織においてのみで行われてもよく、あるいは、動物における、すべての、もしくは実質的にすべての細胞において行われてもよい。トランスジェニック動物の技術は、また、大量の本発明のポリペプチドを与えるために、導入された遺伝子が発現される、全動物の発現 - クローニングシステムを提供する。

【0059】

前述の方法で使用するためのスクリーニング・キットは、本発明のさらなる形態を形成する。かかるスクリーニング・キットは、

- (a) 本発明のポリペプチド；
- (b) 本発明のポリペプチドを発現する組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体；のいずれかを含んでなり、そのポリペプチドは配列番号：2のものであることが好ましい。

【0060】

かかるキットのいずれにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は、実質的構成要素を構成することが理解されるであろう。

【0061】

(用語)

下記の定義は、上で頻繁に用いられる特定の用語の理解を促すために提供するものである。

【0062】

本明細書において用いられる場合、「抗体」はポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、およびヒト化抗体、ならびに、Fabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリの産物を含むFab断片を含む。

【0063】

「単離された」とは、その天然の状態から「ヒトの手によって」変更されたことを意味し、すなわち、天然にある場合には、その元の環境から変えられたか、または取り出されたこと、あるいはその両方を意味する。例えば、生きている生物中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されて」い

ないが、その天然の状態の共存物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書における用語の使用によれば、「単離されて」いる。さらに、形質転換、遺伝子操作または任意の他の組換え法によって、生物に導入されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それがまだ前記生物中であっても「単離されて」おり、その生物は生きていても、生きていなくてもよい。

【0064】

「ポリヌクレオチド」は一般に、ポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)のいずれをも意味し、それらは未改変あるいは改変のRNAまたはDNAであってもよい。「ポリヌクレオチド」は、制限はなく、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖でもよく、もしくはより典型的には二本鎖または一本鎖と二本鎖領域の混合物であってもよい、DNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子を含む。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNAまたはRNAとDNAの両方を含んでなる三本鎖領域を意味する。「ポリヌクレオチド」なる用語は、1つまたは複数の修飾された塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性またはその他の理由により、修飾された主鎖を有するDNAまたはRNAも含む。「修飾」された塩基は、例えば、トリチル化塩基ならびにイノシンなどの普通ではない塩基を含む。DNAおよびRNAに対して、様々な修飾が行われてもよく、したがって、「ポリヌクレオチド」は、天然に典型的に見いだされる、化学的、酵素的、または代謝的に修飾された形態のポリヌクレオチド、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を含む。「ポリヌクレオチド」は、しばしばオリゴヌクレオチドと呼ばれる、比較的短いポリヌクレオチドも含む。

【0065】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合、すなわちペプチドイソステアによって、互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含んでなる、いかなるポリペプチドをも意味する。「ポリペプチド」は、通常は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、ならびに、一般に、蛋白

質と呼ばれる長鎖の双方を意味する。ポリペプチドは、20の遺伝子コードのアミノ酸以外の、アミノ酸を含むことができる。「ポリペプチド」は、翻訳後のプロセシング等の天然プロセス、または当技術分野において周知の化学的修飾法のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列をも含む。かかる修飾は、基本の参考書およびより詳細な研究論文、ならびに多くの研究文献に詳しく記載されている。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、およびアミノまたはカルボキシル末端を含む、ポリペプチド中のいずれで行われてもよい。所与のポリペプチドにおいて、いくつかの部位で、同種の修飾が同じ程度または異なる程度で存在してもよいことは理解されるであろう。同様に、所与のポリペプチドは、多くの種類の修飾を含むことができる。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として、枝分れしていてもよく、また、枝分れを有する、あるいは、有していない、環構造であってもよい。環状の、分枝の、ならびに分枝した環状のポリペプチドは、翻訳後の天然プロセスにより生じることもあり、あるいは、合成法によって製造することもできる。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、ピオチン化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、クロス・リンキング、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合型クロス・リンクの形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPI アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、蛋白分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのトランスファーRNA仲介による蛋白質へのアミノ酸付加、およびユビキチン化が含まれる(例えば、蛋白質 - 構造と分子の性質、第2版(Proteins - Structure and Molecular Properties, 2nd Ed.), T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993; 蛋白質の翻訳後共有修飾(Post-translational Covalent Modification of Proteins), B.C. Johnson Ed., Academic Press, New Yorkの

World, F. , 翻訳後蛋白質修飾：将来の展望と期待 (Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects), 1-12; Seifter et al. 「蛋白質修飾および非蛋白質補助因子の分析 (Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors)」, Meth. Enzymol. , 182, 626-646, 1990, および Rattan et al. , 「蛋白質合成：翻訳後の修飾とエージング (Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging)」, Ann. NY Acad. Sci. , 663, 48-62, 1992参照)。

【0066】

ポリペプチド配列の「断片」とは、その基準となる配列よりも短い、基準とするポリペプチドと基本的に同じ生物機能または活性を保持するポリペプチド配列を意味する。

【0067】

ポリヌクレオチド配列の「断片」は、配列番号：1の基準となる配列よりも短いポリヌクレオチド配列を意味する。

【0068】

「変異体」は、基準となるポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、その基本的性質を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。ポリヌクレオチドの典型的変異体は、基準となるポリヌクレオチドと塩基配列において異なる。変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準となるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることもあれば、変えないこともある。ヌクレオチドの変化は、下記のとおり、基準となる配列によってコードされるポリペプチドにおけるアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端削除を引き起こすこともある。ポリペプチドの典型的変異体は、基準となるポリペプチドとアミノ酸配列において異なる。一般に、変更は、基準となるポリペプチドと変異体との配列は、全体としては非常に類似であり、多くの領域にお

いて、同一となるように限定されている。変異体と基準となるポリペプチドとは、アミノ酸配列において、1つまたは複数の置換、挿入、欠失の任意の組合せにより異なってもよい。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされるものでもよく、コードされないものでもよい。典型的な保存的置換には、Gly、Ala； Val、Ile、Leu； Asp、Glu； Asn、Gln； Ser、Thr； Lys、Arg；ならびにPheとTyrが含まれる。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子などの天然に生じるものでもよく、または天然では生じることが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然に生じる変異体は、突然変異生成技法あるいは直接合成によって作製することもできる。また、変異体として含まれるものは、1つまたは複数の翻訳後の修飾、例えば、グリコシル化、リン酸化、メチル化、ADPリボシル化などを有するポリペプチドである。複数の実施態様は、N末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化ならびにC末端グリシンの修飾を含む。

【0069】

「対立遺伝子」は、ゲノム中の所与の遺伝子座で生じる、遺伝子の2つ以上の別の形態の1つを意味する。

【0070】

「多型性」は、一集団内のゲノムにおける所与の位置のヌクレオチド配列（および、関連して、コードされたポリペプチド配列）における変異を意味する。

【0071】

「1塩基多型性」(SNP)は、一集団内での、ゲノムにおける1個の塩基位置での、ヌクレオチド変異性の出現を意味する。SNPは、遺伝子内またはゲノムの遺伝子間領域内で起こることもある。SNPは、対立遺伝子特異的増幅(ASA)を用いてアッセイすることもできる。この方法には、少なくとも3つのプライマーが必要となる。共通プライマーは、アッセイする多型性に対して、リバーサな相補型で用いる。この共通プライマーは、多型塩基から、50~1500塩基対の間隔が隔っている。他の2つ(またはそれ以上)のプライマーは、最後の3'塩基が、多型性を成す2つ(またはそれ以上)の対立遺伝子の1つに適合

するように、変移することを除き、相互に等しい。次いで、サンプルDNAで2回(またはそれ以上)のPCR反応を、それぞれ共通プライマーおよび対立遺伝子特異的プライマーの1つを用いて実施する。

【0072】

本明細書において用いる場合、「スプライス変異体」は、最初と同じゲノムDNA配列から転写されたが、他の択一的なRNAスプライシングを受けたRNA分子から生成されたcDNA分子を意味する。択一的なRNAスプライシングは、原RNA転写産物が、一般にはイントロンを除去するために、スプライシングを受ける際に生じ、それぞれが異なるアミノ酸配列をコードしてもよい、複数のmRNA分子の産生を引き起こす。スプライス変異体なる用語は、前述のcDNA分子によってコードされる蛋白質をも意味する。

【0073】

「同一性」は、2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の関係性を反映し、その配列の比較により決定される。一般に、同一性は、対比される配列の全長にわたり、2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチドの、それぞれ、塩基対塩基あるいはアミノ酸対アミノ酸の厳密な対応を意味する。

【0074】

「同一性%」 - 正確な対応のない配列については、「同一性%」を求めることができる。一般に、対比すべき2つの配列を、その配列間で最大相関を与えるようにアラインする。これは、1つまたは双方の配列中に、「ギャップ」を挿入して、アライメントの程度を増大させることを含んでもよい。同一性%は、対比する各配列の全長にわたって、決定することもでき(いわゆる、グローバル・アライメント)、これは、同一のまたは非常に類似の長さの配列に対して、特に適しており、あるいは、より短い、定められた長さについて、行うこともでき(いわゆる、ローカル・アライメント)、これは、異なる長さの配列に対して、より適している。

【0075】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列間に関する、さらに、より洗練

された尺度である。一般に、「類似性」は、(同一性と同様に)比較している配列の各一つの対応する残基対間での厳密な対応だけでなく、厳密な対応がない場合には、進化論的な根拠から、一方の残基は他方に置き換わる見込みがあるか否かをも考慮に入れた、残基ごとの、2つのポリペプチド鎖のアミノ酸間の比較を意味する。この見込みには、関連する「スコア」を有し、それに基づき、2つの配列の「類似性%」を決定することができる。

【0076】

2つ以上の配列の同一性および類似性を比較する方法は、当技術分野において周知である。すなわち、例えば、Wisconsin Sequence Analysis Package、バージョン9.1で利用できるプログラム(Devereux J et al., Nucleic Acids Res., 12, 387-395, 1984, Genetics Computer Group、米国ウィスコンシン州マディソンから入手可能)、例えば、BESTFITおよびGAPなるプログラムは、2つのポリヌクレオチド間の同一性%、ならびに2つのポリペプチド配列間の同一性%および類似性%を決定するために、使用することができる。BESTFITは、SmithおよびWaterman(J. Mol. Biol., 147, 195-197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482-489, 1981)の「局所ホモロジー」アルゴリズムを利用して、2つの配列間の類似性が最も高くなる、1つの領域を見いだす。BESTFITは、長さが非類似である、2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列の比較に対して、より適しており、該プログラムは、短い配列は長い配列の一部を代表していると仮定する。それに対し、GAPは、NedlemanおよびWunsch(J. Mol. Biol., 48, 443-453, 1970)のアルゴリズムに従って、「最大の類似性」が見い出されるように、2つの配列のアライメントを行う。GAPは、ほぼ同じ長さであり、また、その全長にわたって、アライメントが予想されるような配列の比較に対して、より適している。各プログラムで用いられる「ギャップ・ウェイト」および「長さ・ウェイト」のパラメーターは、それぞれ、ポリヌクレオチド配列につい

では50および3、ポリペプチド配列については12および4であることが好ましい。同一性%および類似性は、対比する2つの配列が最適にアラインされた時に決定することが好ましい。

【0077】

配列間の同一性および/または類似性を求めるための他のプログラムも、当技術分野において公知であり、例えば、BLASTファミリーのプログラム(Altschul S F et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990, Altschul S F et al., Nucleic Acids Res., 25:389-3402, 1997, National Center for Biotechnology Information (NCBI)、米国メリーランド州ベゼスタから入手でき、www.ncbi.nlm.nih.govのNCBIのホームページからアクセス可能である)およびFASTA(Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 2444-2448, 1988, Wisconsin Sequence Analysis Packageの一部として利用可能)がある。

【0078】

BLOSUM62アミノ酸置換マトリックス(Henikoff S and Henikoff J G, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, 1992)は、比較前に、予めヌクレオチド配列をアミノ酸配列に翻訳する場合を含む、ポリペプチド配列の比較に、用いることが好ましい。

【0079】

プログラム BESTFITは、基準とするポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対する、評価するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の同一性%を決定するために用いることが好ましく、本明細書において前述したように、プログラムのパラメーターをデフォルト値に設定して、評価するものと基準とす

る配列を最適にアラインする。

【0080】

「同一性指数」は、候補配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）と基準とする配列とを比較するために用いることができる、配列関連性の指標である。すなわち、基準とするポリヌクレオチド配列と比較して、例えば、同一性指数0.95を有する候補ポリヌクレオチド配列は、基準とする配列の塩基100個あたり平均で5個までの相違を有する以外は、基準とする配列と一致している。かかる相違は、少なくとも、1つのヌクレオチド欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群より選択される。これらの相違は、基準とするポリヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端の部位、あるいは、これら末端部位の間の任意の位置で生じてもよく、基準とする配列のヌクレオチドの中に個々に、あるいは、基準とする配列内の1つまたは複数の連続したグループ内に散在してもよい。換言すれば、基準とするポリヌクレオチド配列と比較して同一性指数0.95のポリヌクレオチド配列を得るためには、本明細書において前述したとおり、基準とする配列の塩基100個ごとに、平均5個までの欠失、置換または挿入、あるいは、その任意な組合せがなされてもよい。同一性指数の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要な変更を加えて、同じことが適用される。

【0081】

同様に、ポリペプチドについても、基準となるポリペプチド配列と比較して、例えば、同一性指数0.95を有する候補ポリペプチド配列は、基準となる配列のアミノ酸100個あたり平均で5個の相違を有する以外は、基準となる配列と一致している。かかる相違は、少なくとも、1つのアミノ酸欠失、保存的および非保存的置換を含む置換、または挿入からなる群より選択される。これらの相違は、基準となるポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシ末端の部位、あるいは、これら末端の部位の間の任意の位置において生じてもよく、基準となる配列のアミノ酸の中に個々に、もしくは基準となる配列内の、1つまたは複数の連続するグループ中に散在してもよい。換言すれば、基準となるポリペプチド配列と比較して、同一性指数0.95のポリペプチド配列を得るためには、本明細書

において前述したように、基準となる配列のアミノ酸100個ごとに平均5個までの欠失、置換または挿入、あるいは、その任意の組合せがなされていてもよい。同一性指数の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要な変更を加えて、同じことが適用される。

【0082】

塩基またはアミノ酸の相違の数と、同一性指数との間の関係は、下記の式で表すことができる。

$$n_a = x_a - (x_a \cdot I)$$

上式で、

n_a は、塩基またはアミノ酸の相違の数であり、

x_a は、配列番号：1または配列番号：2のそれぞれの塩基またはアミノ酸の総数であり、

I は、同一性指数であり、

\cdot は乗法演算子の記号であり、かつ

x_a と I との積が整数ではない場合、それを x_a から引く前に最も近い整数に四捨五入する。

【0083】

「相同体」は、基準とする配列に対して、高度の配列関連性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を指すために当分野で用いられる一般的用語である。かかる関連性は、本明細書において定義したとおり、2つの配列間の同一性および/または類似性を決定することによって定量化することができる。「オルソログ」および「パラログ」なる用語は、この一般的用語に含まれる。「オルソログ」は、別の種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと機能的に等価なポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。「パラログ」は、同じ種の中で機能的に類似のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。

【0084】

「融合蛋白質」は、2つの無関係の融合された遺伝子またはその断片によってコードされる蛋白質を意味する。その例は、米国特許第5541087号、米国特許第5726044号、欧州特許第574395号、欧州特許第493418

号、および欧州特許第0232262号に開示されている。Fc-ANIC-BPの場合、治療のために用いる際、かかる融合蛋白質の薬物動態における性質を改善し、また、二量体Fc-ANIC-BPを生成するために、Fc-ANIC-BPの機能的発現を行うために、融合蛋白質の一部として免疫グロブリンFc領域を用いることが有利である。Fc-ANIC-BP DNA構築物は、5'から3'の方向に、分泌カセット、すなわち、哺乳動物細胞からの排出を誘発するシグナル配列、融合パートナーとして免疫グロブリンFc領域断片をコードするDNA、およびFc-ANIC-BPをコードするDNAを含む。ある用途では、融合蛋白質の残りに影響を与えないが、機能的なFc側を突然変異させることで、その固有の機能的性質（補体結合、Fc受容体結合）を変える、または、発現後にFc部分が完全に除去されること可能とすることが望ましい。

【0085】

本明細書に引用する、特許および特許出願を含むがこれらに限定されることはない、すべての出版物および文献は、個々の出版物または文献が全面的に示されるとおり参照として本明細書に組み込まれると、具体的かつ個別に示されたかのごとく、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。本出願が優先権を主張するいかなる特許出願も、出版物および文献に関して前述した様式で、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。

【0086】

（さらなる例示）

実施例1

外傷性脳傷害モデル

外傷性脳傷害（TBI）に反応してアップまたはダウン・レギュレーションされた遺伝子の同定を、ラテラル・フラッド法を用いてラットで試験した。雄Sprague-Dawleyラットで右頭頂皮質に集中した中等度TBIを、ラテラルフラッドパーカッション法により誘発した。TBIの5日後、ラットを屠殺し、摘出した脳組織をディファレンシャルディスプレイにより分析した。外傷を受けた脳の小脳において、RT-PCRにより蛋白質のアップレギュレーションが確認された。

【0087】

対照群のラットを麻酔し、側頭筋を収縮させたが、開頭術は行わなかった。5日間生存後、すべてのラットに麻酔をかけ、屠殺し、脳を摘出して液体窒素中で凍結した。

【0088】

第2のTBIラット群を用いて、組織化学的および免疫組織化学的染色を行った。TBIの1週間後、これらのラットを麻酔し、食塩水と、続いて3%パラホルムアルデヒドで灌流した。脳を凍結ミクロトームで30 μ mの冠状切片に切断した。

【0089】

実施例2

免疫組織化学

小脳切片をモノクローナル抗体でカルシウム結合蛋白質に対して標識した。免疫複合体を、アビジン - ビオチン / DAB法を用いて可視化した。陽性対照として、カルビンジン - D (28kD) を小脳プルキンエ細胞の信頼性のある標識として用いた。

【0090】

実施例3

系内ハイブリダイゼーション

配列番号1 (センス、アンチセンス) から選択したオリゴデオキシヌクレオチドを、当業者には明白な標準法に従って設計した。これらのプローブを、当技術分野において公知の方法に従い、ラット脳組織切片における系内ハイブリダイゼーションに用いた。オートラジオグラフをKodak BioMax - Filmに5日間曝露した後、可視化した。

【0091】

実施例4

TBIラットからのRNA単離

任意の真核細胞におけるmRNAレベルでの変異遺伝子発現を同定し、分析するための方法として、mRNAディファレンシャル・ディスプレイが開発された

(Liang and Pardee, Science 257, 967, 1992)。本発明において、発明者らはCNS損傷の分子的影響についてより詳しい知見を得るために、この方法を用いて外傷性脳傷害に反応してアップまたはダウン・レギュレーションされた遺伝子を試験した(den Daas et al.; Meeting of the American Neuroscience Society Washington D.C., USA; 1998)。外傷性脳傷害の動物モデルはラテラル・フラッド・パーカッション・モデルと呼ばれ、下記のとおりに行う。雄Sprague-Dawleyラットでラテラル・フラッド・パーカッション法により脳の右頭頂皮質に集中した中等度外傷性脳傷害を誘発した。対照ラットを麻酔し、側頭筋を収縮させたが、開頭術は行わなかった。5日間生存後、ラットに麻酔をかけ、屠殺し、脳を摘出して液体窒素中で凍結した。全脳をホモジェナイズし、全RNAを単離した(Sambrook et al., 1989)。

【0092】

ディファレンシャル・ディスプレイ

得られたRNAをRNAディファレンシャル・ディスプレイで分析した。mRNAの逆転写を、2つの付加的な塩基がすべての可能な組合せで有するオリゴdTプライマー(下流プライマー; 13塩基長)を用いて行い、したがって反応物をポリ(A)テールの初めに固定した。cDNAの増幅を、同じ3'プライマーおよび第2の10塩基長の任意5'プライマー(上流プライマー)を用いて行った。増幅産物を非変性10%ポリアクリルアミドゲル(Amersham Pharmacia Biotech、ドイツ)上で分析した。DNAを銀染色により可視化した。染色後、ゲルを室温で1時間乾燥した(図1)。区別的に制御されたバンドをゲルから切り出した。DNAを溶出し、再増幅し、pCR2.1ベクター(Invitrogen、米国)にサブクローニングした。サブクローニングした断片をSanger法により配列決定し(Sanger F. et al., PNAS USA, 74, 5463-5467)、配列をゲノムデータベースと比較した。得られた遺伝子断片の確認を、逆転写PCR(RT-PCR)により行った。特異的に発現されたラットMo25の確認のため、特

異的な19塩基長および21塩基長のプライマーによるTitanワンチューブRT-PCRシステム(Boehringer Mannheim、ドイツ)を用いてRT-PCRにより配列を分析した。RT-PCRには対照群およびTBIラットからの全RNA1μgを用いた。さらに遺伝子確認を、ラットMo25からのプローブによるドット・プロット法およびヒトMo25からのプローブによるノーザン・プロット分析を用いて実施した。

【0093】

逆転写PCR(RT-PCR)

特異的に発現された卒中誘発性カルシウム結合蛋白質の確認のため、特異的な19塩基長および21塩基長プライマーによる、TitanワンチューブRT-PCRシステム(Boehringer Mannheim、ドイツ)を用いてRT-PCRにより配列を分析した。RT-PCRには対照群およびTBIラットからの全RNA1μgを用いた。

【0094】

リアルタイムPCR

頭部外傷後のラット脳におけるANIC-BPの分布を、リアルタイムTaqMan PCR法によりABIプリズム7700配列検出システム(PE、Applied Biosystems、ドイツ)で調べた。この方法により、mRNAの絶対濃度を高感度で測定することができる。25および29塩基長の特定プライマーと、32塩基長のTaqManプローブ(レポーター色素:FAM/クエンチャー色素:TAMRA)を設計した。

【0095】

Ca²⁺結合

SDS-PAGEによって分離した蛋白質をニトロセルロースメンブレン上にプロットし、放射性標識Ca²⁺の結合について、Maruyama, K. et al. (J. Biochem. 95:511-519, 1984)によって記載された方法を用いてアッセイした。インキュベーション後、過剰の同位体を洗浄し、そして、メンブレンをKodak XOMAT-TMフィルムに適当な時間曝露した。バンドは結合蛋白質の位置で現像された。該結合蛋白質に特

異的な抗体を用いて、当技術分野において周知のウェスタン・プロット法によつて、その抗体を付加することにより、結合蛋白質の存在を確認した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Merck Patent GmbH
5 <120> Acute Neuronal Calcium Binding Protein
<130> ANICBPJDDWS
<140>
10 <141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
15 <210> 1
<211> 1026
<212> DNA
<213> Homo sapiens
20 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1026)
25 <400> 1
atg ccg ttc ccg ttt ggg aag tct cac aaa tct cca gca gac att gtg 48
Met Pro Phe Pro Phe Gly Lys Ser His Lys Ser Pro Ala Asp Ile Val
1 5 10 15
30 aag aat ctg aag gag agc atg gct gtt ctg gaa aag caa gac att tct 96
Lys Asn Leu Lys Glu Ser Met Ala Val Leu Glu Lys Gln Asp Ile Ser
20 25 30
35 gat aaa aaa gca gaa aag gct aca gaa gaa gtt tcc aaa aat ctg gtt 144
Asp Lys Lys Ala Glu Lys Ala Thr Glu Glu Val Ser Lys Asn Leu Val
35 40 45
40 gcc atg aaa gaa att ctg tat ggc aca aat gaa aaa gag cct cag aca 192
Ala Met Lys Glu Ile Leu Tyr Gly Thr Asn Glu Lys Glu Pro Gln Thr
50 55 60
45 gaa gca gta gct caa ctt gct caa gaa ctc tat aat agt ggg ctc ctt 240
Glu Ala Val Ala Gln Leu Ala Gln Glu Leu Tyr Asn Ser Gly Leu Leu
65 70 75 80
50 agc acc ctg gta gct gat tta cag ctc att gac ttt gag ggc aaa aaa 288
Ser Thr Leu Val Ala Asp Leu Gln Leu Ile Asp Phe Glu Gly Lys Lys
85 90 95
55 gac gtg gct caa att ttc aac aat att ctc aga aga caa att ggt acg 336
Asp Val Ala Gln Ile Phe Asn Asn Ile Leu Arg Arg Gln Ile Gly Thr
100 105 110
60 aga act cct act gtt gaa tac atc tgc acc caa cag aat att ttg ttc 384
Arg Thr Pro Thr Val Glu Tyr Ile Cys Thr Gln Gln Asn Ile Leu Phe
115 120 125
atg tta ttg aaa ggg tat gaa tct cca gaa ata gct cta aat tgt gga 432
Met Leu Leu Lys Gly Tyr Glu Ser Pro Glu Ile Ala Leu Asn Cys Gly
130 135 140

```

	ata atg tta aga gaa tgc atc aga cat gaa cca ctt gca aaa atc att	480
	Ile Met Leu Arg Glu Cys Ile Arg His Glu Pro Leu Ala Lys Ile Ile	
	145	150 155 160
5	ttg tgg tog gaa cag ttt tat gat ttc ttc aga tat gtc gaa atg tca	528
	Leu Trp Ser Glu Gln Phe Tyr Asp Phe Phe Arg Tyr Val Glu Met Ser	
	165	170 175
10	aca ttt gac ata gct tca gat gca ttt gcc aca ttc aag gat tta ctt	576
	Thr Phe Asp Ile Ala Ser Asp Ala Phe Ala Thr Phe Lys Asp Leu Leu	
	180	185 190
15	aca aga cat aaa ttg ctc agt gca gaa ttt ttg gaa cag cat tat gat	624
	Thr Arg His Lys Leu Leu Ser Ala Glu Phe Leu Glu Gln His Tyr Asp	
	195	200 205
20	aga ttt ttc agt gaa tat gag aag tta ctt cat tca gaa aat tat gtg	672
	Arg Phe Phe Ser Glu Tyr Glu Lys Leu Leu His Ser Glu Asn Tyr Val	
	210	215 220
25	aca aaa aga cag tca ctg aag ctt ctc ggt gaa cta cta cta gat aga	720
	Thr Lys Arg Gln Ser Leu Lys Leu Leu Gly Glu Leu Leu Leu Asp Arg	
	225	230 235 240
30	cac aac ttc aca att atg aca aaa tac atc agt aaa cct gag aac ctc	768
	His Asn Phe Thr Ile Met Thr Lys Tyr Ile Ser Lys Pro Glu Asn Leu	
	245	250 255
35	aaa tta atg atg aac ctg ctg cga gac aaa agt cgc aac atc cag ttt	816
	Lys Leu Met Met Asn Leu Leu Arg Asp Lys Ser Arg Asn Ile Gln Phe	
	260	265 270
40	gag gcc ttt cac gtt ttt aag gtg ttt gta gcc aat cct aac aag acg	864
	Glu Ala Phe His Val Phe Lys Val Phe Val Ala Asn Pro Asn Lys Thr	
	275	280 285
45	cag ccc atc cta gac atc ctc ctc aag aac cag gcc aaa ctc ata gag	912
	Gln Pro Ile Leu Asp Ile Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Leu Ile Glu	
	290	295 300
50	ttc ctc agc aag ttt cag aac gac agg acg gag gat gag cag ttt aac	960
	Phe Leu Ser Lys Phe Gln Asn Asp Arg Thr Glu Asp Glu Gln Phe Asn	
	305	310 315 320
50	gac gag aag acc tat tta gtt aaa cag atc agg gat ttg aag aga cca	1008
	Asp Glu Lys Thr Tyr Leu Val Lys Gln Ile Arg Asp Leu Lys Arg Pro	
	325	330 335
50	gct cag caa gaa gct taa	1026
	Ala Gln Gln Glu Ala	
	340	

```

<210> 2
<211> 341
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens.

<400> 2
Met Pro Phe Pro Phe Gly Lys Ser His Lys Ser Pro Ala Asp Ile Val
 1          5          10
10 Lys Asn Leu Lys Glu Ser Met Ala Val Leu Glu Lys Gln Asp Ile Ser
    20          25          30
    Asp Lys Lys Ala Glu Lys Ala Thr Glu Glu Val Ser Lys Asn Leu Val
    35          40          45
15 Ala Met Lys Glu Ile Leu Tyr Gly Thr Asn Glu Lys Glu Pro Gln Thr
    50          55          60
    Glu Ala Val Ala Gln Leu Ala Gln Glu Leu Tyr Asn Ser Gly Leu Leu
    65          70          75          80
    Ser Thr Leu Val Ala Asp Leu Gln Leu Ile Asp Phe Glu Gly Lys Lys
    85          90          95
20 Asp Val Ala Gln Ile Phe Asn Asn Ile Leu Arg Arg Gln Ile Gly Thr
    100          105          110
    Arg Thr Pro Thr Val Glu Tyr Ile Cys Thr Gln Gln Asn Ile Leu Phe
    115          120          125
25 Met Leu Leu Lys Gly Tyr Glu Ser Pro Glu Ile Ala Leu Asn Cys Gly
    130          135          140
    Ile Met Leu Arg Glu Cys Ile Arg His Glu Pro Leu Ala Lys Ile Ile
    145          150          155          160
    Leu Trp Ser Glu Gln Phe Tyr Asp Phe Phe Arg Tyr Val Glu Met Ser
    165          170          175
30 Thr Phe Asp Ile Ala Ser Asp Ala Phe Ala Thr Phe Lys Asp Leu Leu
    180          185          190
    Thr Arg His Lys Leu Leu Ser Ala Glu Phe Leu Glu Gln His Tyr Asp
    195          200          205
    Arg Phe Phe Ser Glu Tyr Glu Lys Leu Leu His Ser Glu Asn Tyr Val
35  210          215          220
    Thr Lys Arg Gln Ser Leu Lys Leu Leu Gly Glu Leu Leu Leu Asp Arg
    225          230          235          240
    His Asn Phe Thr Ile Met Thr Lys Tyr Ile Ser Lys Pro Glu Asn Leu
    245          250          255
40 Lys Leu Met Met Asn Leu Leu Arg Asp Lys Ser Arg Asn Ile Gln Phe
    260          265          270
    Glu Ala Phe His Val Phe Lys Val Phe Val Ala Asn Pro Asn Lys Thr
    275          280          285
    Gln Pro Ile Leu Asp Ile Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Leu Ile Glu
45  290          295          300
    Phe Leu Ser Lys Phe Gln Asn Asp Arg Thr Glu Asp Glu Gln Phe Asn
    305          310          315          320
    Asp Glu Lys Thr Tyr Leu Val Lys Gln Ile Arg Asp Leu Lys Arg Pro
    325          330          335
50 Ala Gln Gln Glu Ala
    340

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

傷害側の対側小脳半球において、特異的に制御されたバンドを有する、代表的なmRNAの対比的なディスプレイ・ゲルを示す図である。矢印は特異的に発現されたバンドを示す。

【図2】

TBI後の小脳における、ラットMo25の270塩基対遺伝子断片による、それぞれ5、10、15、20、25および30サイクルのRT-PCRを示す

図である。20、25および30サイクルにおいて、L2レーンにおける強い発現に留意されたい。

L2：TBIラット非傷害側のcDNA；R2：TBIラット傷害側のcDNA

。

【図3】

TBI後のラット小脳mRNAを用いた、ラットMo25の放射性³²P標識270塩基対遺伝子断片によるドット・プロット分析を示す図である。6匹の個々のラットを試験し、3匹はTBI処置し、3匹は偽処置した。

【図4】

ラットMo25の放射性³²P標識270塩基対遺伝子断片による、8つのラット組織にハイブリダイズした、多組織ノーザン・プロット(Clontech Laboratories Inc、米国カリフォルニア州パロアルト)を示す図である。

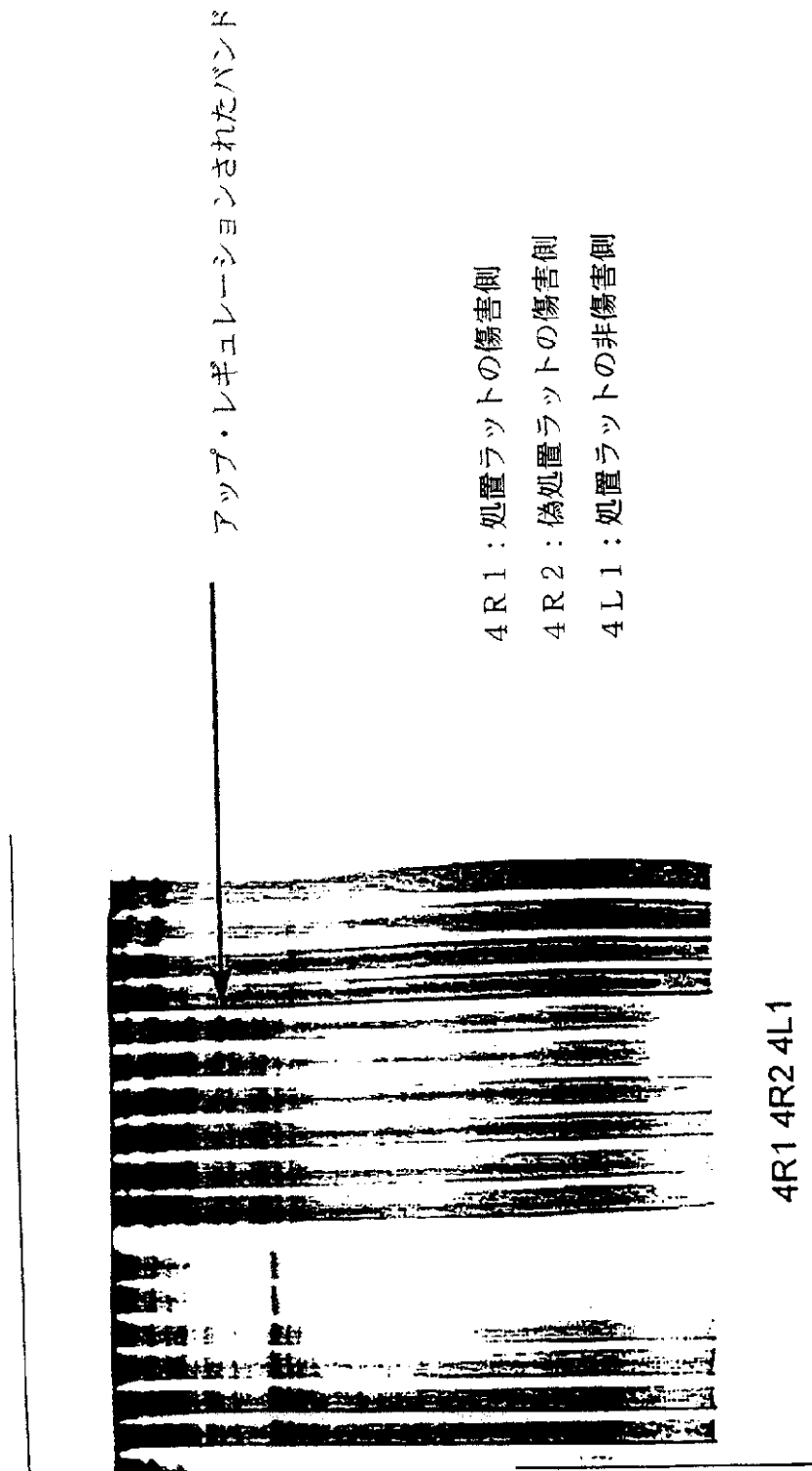
【図5】

ラット脳切片の系内ハイブリダイゼーションを示す図である。SICCBPおよびMo25に特異的なセンスおよびアンチセンスプローブを用いた。アンチセンスプローブを用いた際に、有髄神経索(脳梁、視索、中間嗅索、小脳前交連)にて示される強いシグナルが観察された。

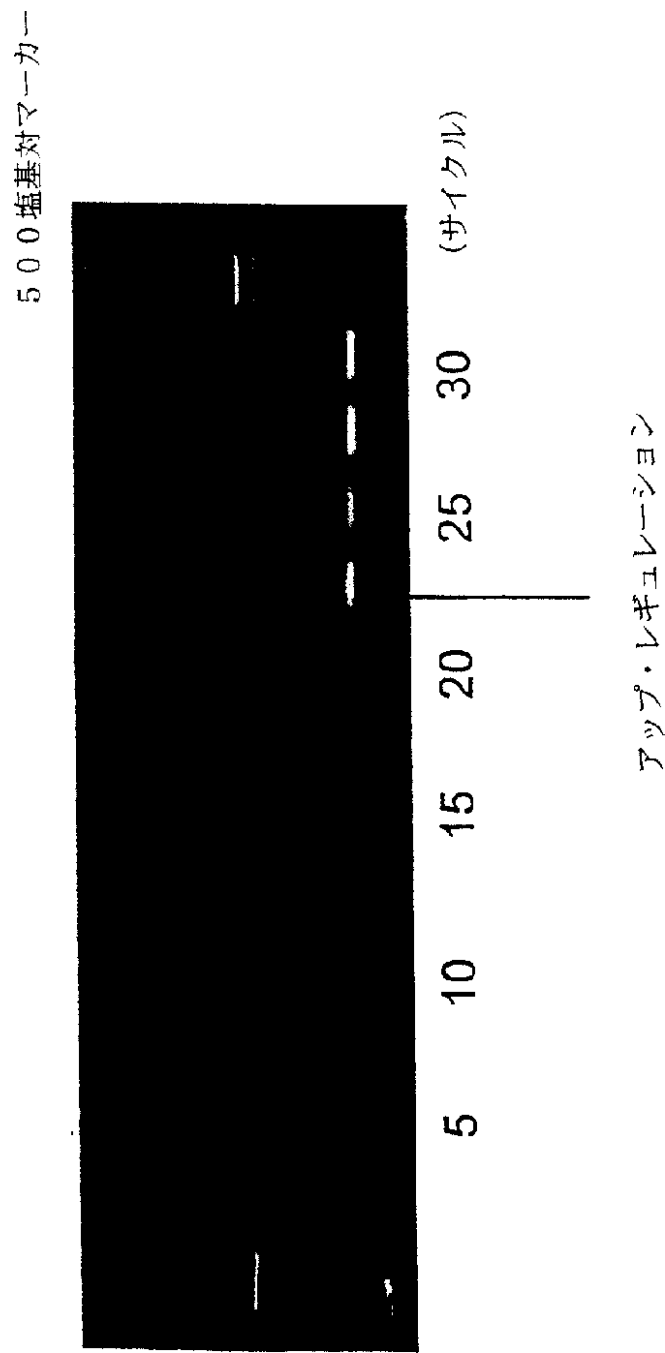
【図6】

外傷性脳傷害の7日後のラットにおける、ANIC-BPのリアルタイムTaqMan PCR増幅を示す図である。非傷害皮質側、傷害皮質側、ならびに小脳を、偽処置ラット脳と実験後7日で屠殺したラットの脳組織によって比較した。誤差バーは、平均値に対する標準誤差(S.E.M.)である。

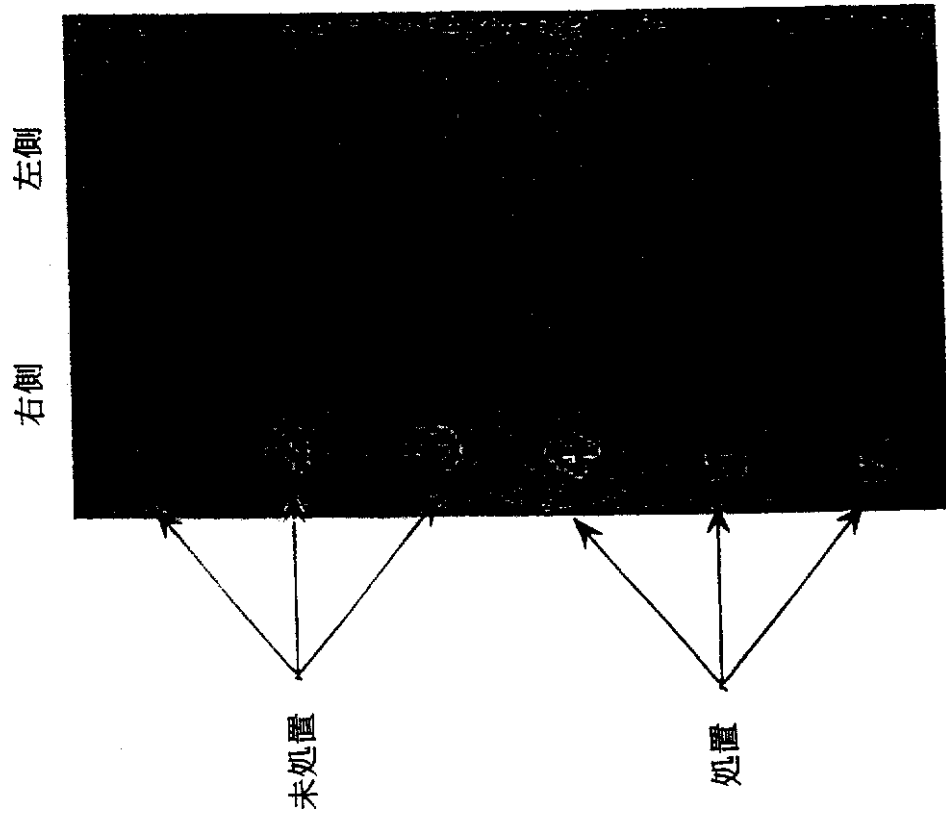
【図1】



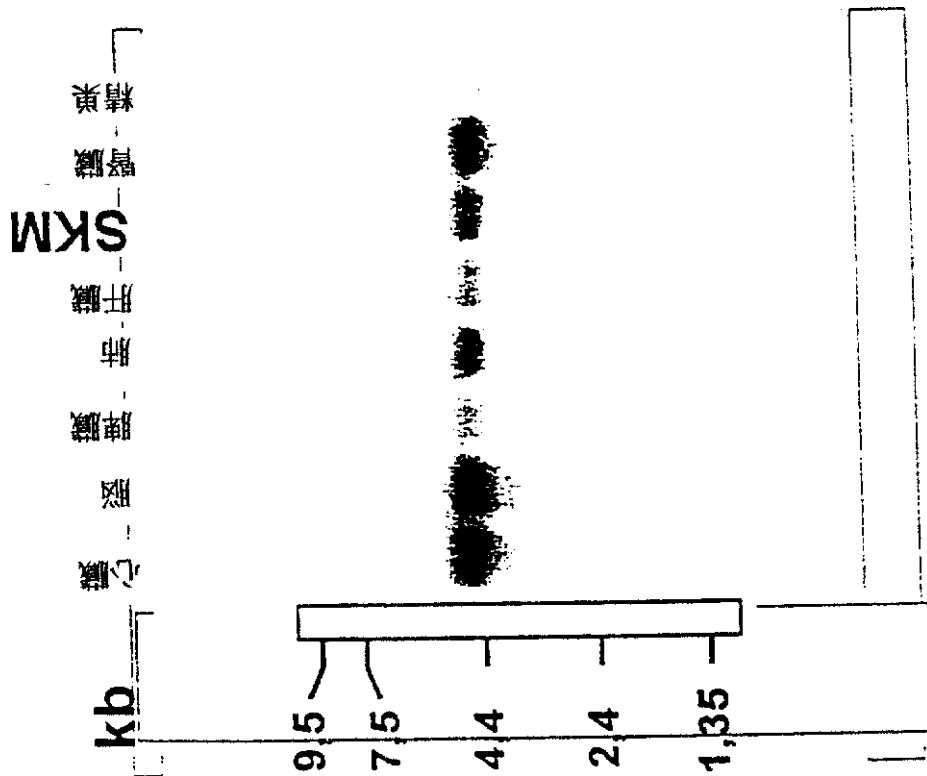
【図2】



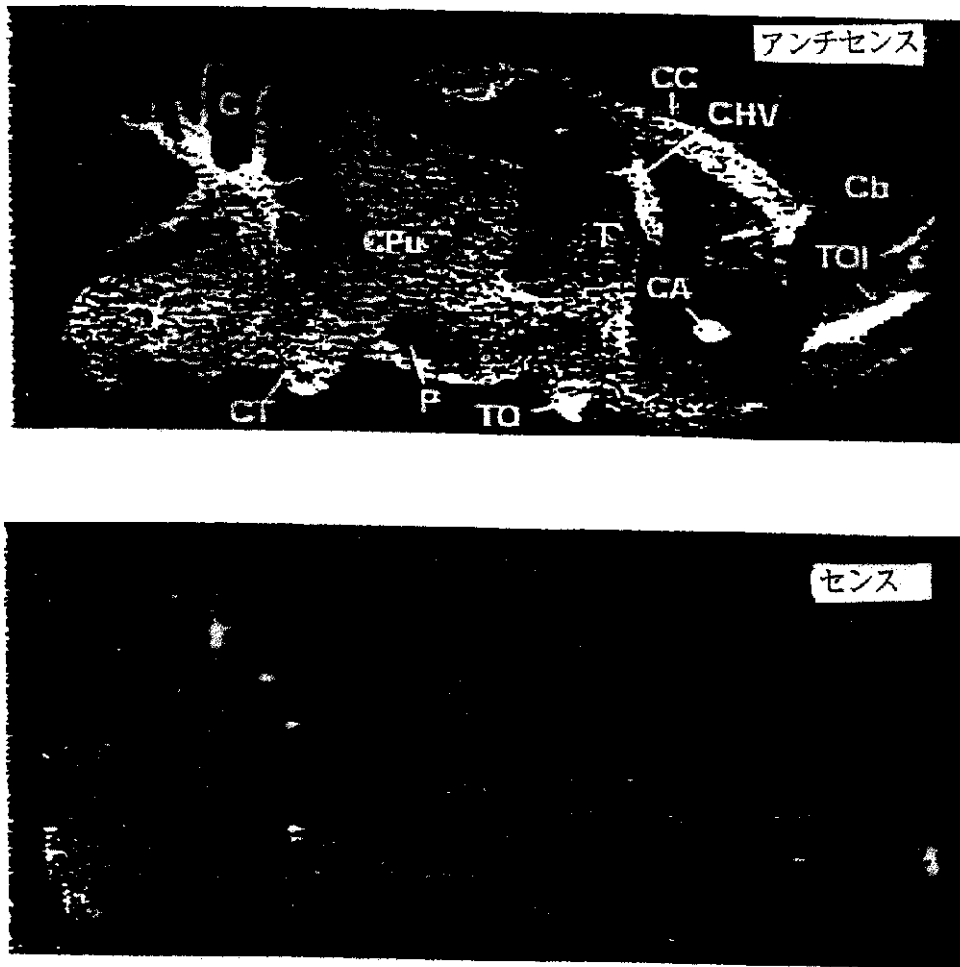
【图3】



【图4】



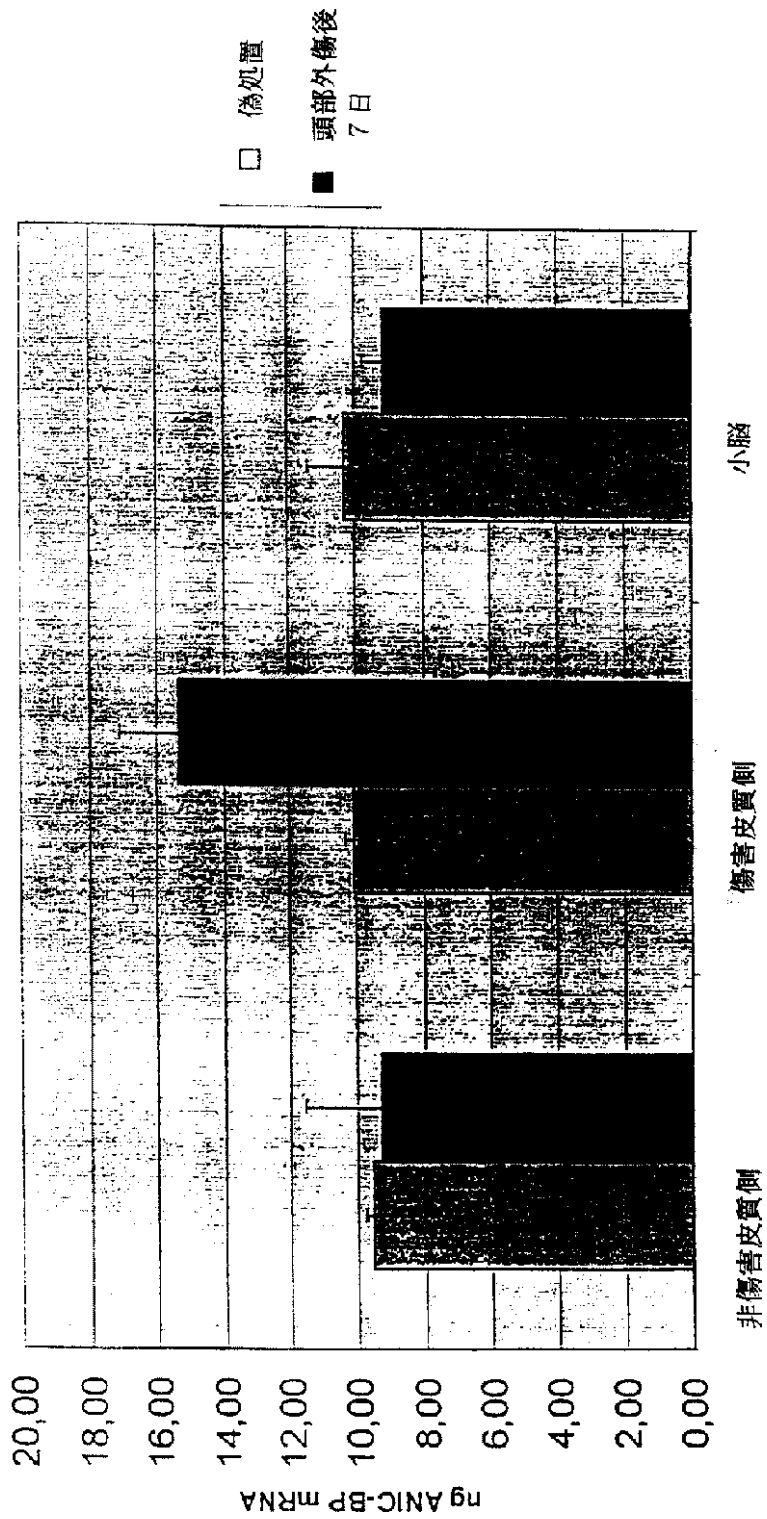
【図5】



- | | | | |
|-----|--------|-----|------|
| C | 小脳 | CT | 台形体 |
| CA | 前交連 | FL | 縦束 |
| Cb | 大脳 | NT | 三叉神経 |
| CC | 脳梁 | P | 橋 |
| CHV | 腹側海馬交連 | SM | 視床髄条 |
| CI | 下丘 | T | 視床 |
| CPu | 尾状核/被殻 | TO | 視索 |
| CS | 上丘 | TOI | 中間嗅索 |

【図6】

頭部外傷後のANIC-BPの発現



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/EP 00/05457
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/19 C07K16/18 G01N33/68		
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 C12N 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, EPQ-Internal, CHEM ABS Data, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIYAMOTO HIROSHI ET AL: "Molecular cloning of a novel mRNA sequence expressed in cleavage stage mouse embryos." MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, vol. 34, no. 1, 1993, pages 1-7, XP000892775 ISSN: 1040-452X cited in the application abstract page 5, right-hand column, paragraph 2 -page 7, right-hand column, paragraph 2; figure 4 --- -/-	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 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 1 November 2000		Date of mailing of the international search report 15/11/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 00/05457

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! Accession number AF151824, 1 June 1999 (1999-06-01) LAI C.-H. ET AL.: "Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in Caenorhabditis elegans by Comparative Proteomics" XP002151724 abstract -----	1-11
A	US 5 804 419 A (CORLEY NEIL C ET AL) 8 September 1998 (1998-09-08) the whole document -----	1-11
P,X	WO 00 29580 A (INCYTE PHARMA INC ;CORLEY NEIL C (US); GORGONE GINA A (US); GUEGLE) 25 May 2000 (2000-05-25) figure SEQ.3 -----	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05457

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5804419 A	08-09-1998	AU 8269698 A	19-01-1999
		EP 1002074 A	24-05-2000
		US 5929029 A	27-07-1999
		WQ 9900500 A	07-01-1999
WO 0029580 A	25-05-2000	US 6071721 A	06-06-2000
		AU 1724300 A	05-06-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/15	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5
	1/19		1/21	
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A

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

(71)出願人 Frankfurter Str. 250,
D - 64293 Darmstadt, Federal Republic of Germany

(72)発明者 デン ダース、 イツァーク
ドイツ連邦共和国 デー - 64407 フレーンキッシュ - クルムバッハ シュラーシュトラーセ 76

(72)発明者 フィッシャー、 フィオラ
ドイツ連邦共和国 デー - 55122 マインツ アン デル アリー 80

(72)発明者 セイフリート、 クリストフ
ドイツ連邦共和国 デー - 64342 シーハイム マーチルデンシュトラーセ 6

(72)発明者 フォン メルヒナー、 ローリー
ドイツ連邦共和国 デー - 64380 ロッスドルフ ハイネリッヒ ハイネ - シュトラーセ 6 .

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 HA14
4B063 QA01 QA18 QR48 QS03 QS34
4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41
CA40 DA75 EA21 EA23 EA50
FA74

专利名称(译)	头部损伤诱导细胞质钙结合蛋白		
公开(公告)号	JP2003503024A	公开(公告)日	2003-01-28
申请号	JP2001505689	申请日	2000-06-14
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	デンダースイツアーク フィッシャーフィオラ セイフリートクリストフ フォンメルヒナーローリー		
发明人	デンダース、イツアーク フィッシャー、フィオラ セイフリート、クリストフ フォンメルヒナー、ローリー		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/4728 C07K2319/00		
FI分类号	C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1 /02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024 /HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QR48 4B063/QS03 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065 /CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA23 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	1999112024 1999-06-22 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了ANIC-BP多肽和多核苷酸以及通过重组技术生产这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用ANIC-BP多肽和多核苷酸的方法。

