

(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 - 511026

(P2003 - 511026A)

(43)公表日 平成15年3月25日 (2003.3.25)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 P 25/00	2 G 0 4 5
A 6 1 P 25/00		C 0 7 K 14/47	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 6 3
16/18		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 - 528576(P2001 - 528576)

(86) (22)出願日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月4日(2002.4.4)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/09475

(87)国際公開番号 W001/025423

(87)国際公開日 平成13年4月12日(2001.4.12)

(31)優先権主張番号 99119113.1

(32)優先日 平成11年10月4日(1999.10.4)

(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 デュッカー、 クラウス
ドイツ連邦共和国 64291 ダームシュタ
ット エテスターシュトラーセ 5

(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】 頭部外傷により誘導される細胞質カルシウム結合タンパク質のスプライス変異体

(57)【要約】

ANIC - BP - 1Bポリペプチドおよびそのポリヌクレオチド、ならびにそのようなポリペプチドを組換え技術によって製造するための方法が開示される。ANIC - BP - 1Bポリペプチドおよびそのポリヌクレオチドを診断アッセイにおいて用いるための方法もまた開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号1の配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチド；

(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む単離されたポリペプチド；

(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されたポリペプチド；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) におけるそのようなポリペプチドのフラグメントおよび変異体

からなる群の1つから選択される単離されたポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2のポリペプチド配列を含む、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【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に記載の単離されたポリペプチド。

【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む単離されたポリヌクレオチド；

(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されたポリヌクレオチド；

(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む単離されたポリヌクレオチド；

(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%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されたポリヌクレオチド；

(e) 配列番号1の配列または少なくとも15ヌクレオチドを有するそのフラグメントを有する標識されたプローブを用いたストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のもとでライブラリーをスクリーニングすることによって得られ

る少なくとも100ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチド；

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

からなる群の1つから選択される単離されたポリヌクレオチド、または前記単離されたポリヌクレオチドに対して相補的なポリヌクレオチド配列、ならびに上記ポリヌクレオチドの変異体およびフラグメントであるポリヌクレオチド、または上記ポリヌクレオチドに対してその全長にわたって相補的なポリヌクレオチド。

【請求項5】 (a) 配列番号1のポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1の単離されたポリヌクレオチド；

(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む単離されたポリヌクレオチド；および

(d) 配列番号2のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドからなる群から選択される、請求項4に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 発現ベクターが適合性宿主細胞に存在するときに請求項1に記載のポリペプチドを産生し得るポリヌクレオチドを含む発現システム。

【請求項7】 請求項1に記載されるポリペプチドを発現する、請求項6に記載される発現ベクターを含む組換え宿主細胞またはその膜。

【請求項8】 請求項1に記載されるポリペプチドを製造するための方法であって、請求項7に記載される宿主細胞を前記ポリペプチドの産生に十分な条件のもとで培養して、前記ポリペプチドを培養培地から回収するステップを含む方法。

【請求項9】 免疫グロブリンのFc領域と請求項1に記載されるポリペプチドのいずれか1つとからなる融合タンパク質。

【請求項10】 請求項1から3のいずれか一項に記載されるポリペプチドに対して免疫特異的な抗体。

【請求項11】 請求項1に記載されるポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

(a) 前記ポリペプチド(または前記ポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合タンパク質に対する候補化合物の結合を、前記候補化合物に直接的または間接的に結合している標識によって定量的または定性的に測定または検出すること;

(b) 前記ポリペプチド(または前記ポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合タンパク質に対する候補化合物の結合の競合を、標識された競合剤の存在下で測定すること;

(c) 前記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前記候補化合物が生じさせるかどうかを、前記ポリペプチドを発現する細胞または細胞膜に適切な検出システムを使用して試験すること;

(d) 候補化合物を、請求項1に記載されるポリペプチドを含有する溶液と混合して混合物を作製し、混合物中の前記ポリペプチドの活性を測定し、その後、候補化合物を含有しないコントロール混合物に対して混合物の活性を比較すること;または

(e) 前記ポリペプチドをコードするmRNAまたは前記ポリペプチドの細胞における産生に対する候補化合物の作用を、例えばELISAアッセイを使用して検出すること;および

(f) 生物学または化学の標準的な技術に従って前記化合物を製造することからなる群から選択される方法を含む。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、ヒト急性ニューロン誘導型カルシウム結合タンパク質 (Acute Neuronal Induced Calcium-Binding Protein: ANIC-BP) 様タンパク質のスプライス変異体の核酸配列およびアミノ酸配列、ならびにこれらの配列の使用に関する。この変異体は本明細書中では「ANIC-BP-1B」と呼ばれることがある。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞および抗体を提供する。さらに、本発明は、そのようなタンパク質の産生方法、およびそのようなタンパク質の発現が関係している障害を処置または防止するための方法を提供する。本発明はまた、そのようなポリヌクレオチドおよびポリペプチドの作用を阻害または活性化することに関する。

【0002】**(発明の背景)**

発作および急性頭部外傷、多発性硬化症および脊髄損傷は、これまで治療法が得られていない疾患である。発作は3番目に大きな死因であり、患者ならびに社会に対する負担は莫大である。発作の大部分を占める虚血性発作の場合、脳における血管の遮断が最初の事象である。頭部の外傷事故は、西洋社会における若年者の主要な疾患である。それよりもはるかに少ない数の患者が、機械的な衝撃および動脈破裂により引き起こされる出血性発作に襲われている。認証されている治療薬がほとんど利用できないことが共通した特徴である。現在利用できる処置方法は、限局的な脳虚血に関する実験研究から得られる病理生理学的な考えに基づいている。これらには、動脈再開通、炎症プロセスの阻害およびニューロン保護に対する薬理学的方法が含まれる。動脈再灌流法に関するさらなる研究が現在行われている。多型核白血球に依存した内皮細胞接着受容体アンタゴニストを用いた初期の臨床研究が完了しようとしているが、具体的な方法はまだ現れていない。しかし、虚血カスケード内の一段階だけを対処する何らかの方法は限られた効果のみをもたらすと考えられる。したがって、将来の治療法は、最も適切には療法の組合せに基づく。低用量のアセチルサリチル酸 (ASA) と放出形態が変

化しているジピリダモール (dipyridamole) との組合せが、発作の二次防止において累積的であることが示されている (Tijssen 他、Int. J. Clin. Pract. 増補91、14~16、1997)。臨床評価のために現在提案されている別の組合せは、tPA + 効果的なニューロン保護剤である。しかし、これらの研究の結果は、非常に効果的であるということからはほど遠いものである。したがって、急性神経損傷作用、および多発性硬化症などの障害に苦しんでいる患者を処置するための新しい薬物を開発し、そしてそのような処置のためにより一般に有用な方法を確認するために使用され得る薬物標的を提供するために、病理生理学的機構に関する多くの事項を知ることが差し迫って求められている。

【0003】

本発明は、ニューロン保護における Ca^{2+} 結合タンパク質の役割に対する証拠がかなり存在するので Ca^{2+} 結合タンパク質を重点的に扱う。様々なカルシウム結合タンパク質 (CaBP) の正確な機能は完全には理解されていないが、CaBP は細胞内 Ca^{2+} レベルを緩衝化するように作用していることが提案されている。 Ca^{2+} の過負荷は、タンパク質分解およびミトコンドリア機能不全をもたらす生化学的プロセスを活性化するので、CaBP のこの緩衝化能は、興奮毒性的なニューロン傷害に対する保護作用を有すると考えられる (Heizmann 他、TINS、15、259~64、1992)。 Ca^{2+} レベルの調節およびニューロン保護における CaBP のこの提案された役割を裏付ける様々な証拠が存在する。

【0004】

中枢神経性で発現している主要な Ca^{2+} 結合タンパク質 (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、様々なニューロン集団において非常に変わった選択的な発現パターンを有している。CaBP を発現するニューロンの中で、大部分は1つのタイプのみを発現しているが、少数のニューロンは主要なカルシウム結合タンパク質の2つ以上を発現している。特定の細胞タイプにおける CaBP の存在または非存在が選択的易損性として知られている現象の基礎であるという証拠が増大している。選択的易損性は、中枢神

経系 (CNS) 損傷の特定のタイプに応答して死亡させる特定のタイプのニューロンの性質である。例えば、CA1海馬ニューロンは全体的な虚血に対して選択的易損性であり、小脳プルキンエ細胞は、頭部外傷、発作および胎児アルコール曝露に対して選択的易損性であり、そして黒質 (Substantia nigra) におけるニューロンはパーキンソン病に対して選択的易損性である。選択的なニューロン易損性を様々なCaBPの発現パターンと関連づける試みが行われている。高レベルのCaBPが、損傷に対して選択的易損性であるニューロン集団において見出されると報告する著者がいる一方で、高レベルのCaBPが、損傷に対して選択的耐性であるニューロン集団において見出されると報告する著者がいる。例えば、高レベルのプルブアルブミンを発現するニューロンは、AMPA誘導毒性に対して選択的易損性であることが報告されており (Weiss他、Neurology、40、1288~1292、1990)、これに対して、高レベルのカルビンジン-D28Kを発現する培養された海馬ニューロンは、グルタミン酸誘導毒性に対して選択的耐性であることが報告されている (Baimebridge他、TINS、15、303~8、1992)。同様に、高レベルのカルレチニンを発現する海馬ニューロンは、興奮性毒素のグルタミン酸、NMDA、カイニン酸およびキスカル酸の毒性用量に対して耐性である (Winsky他、Novel Calcium-Binding Proteins (新規なカルシウム結合タンパク質)、277~300、1991年)。

【0005】

CaBPは、様々なCNS疾患状態において発現が変化していることもまた示されている。しかし、再度ではあるが、その結果は、CaBPの発現が損傷に対して選択的易損性または選択的耐性であるかどうかについて一致していない。カルビンジン-D28Kを発現するニューロンは、アルツハイマー病において易損性 (Iacopino他、PNAS、87、4078~82、1990; Hof他、Exp. Neurology、111、293~301、1991) であり、そしてハンチントン病において易損性 (Kiyama他、Brain Res.、526、303~07、1990) であると報告されているが、カルビンジン-D28Kを発現する黒質内のニューロンはパーキンソン病において選択的易損性

ではない(Yamada他、Brain Res., 526, 303~07, 1990)。全体的な虚血のスナネズミモデルにおいて、ある種の海馬細胞タイプにおけるパルプアルブミンの存在は、生存と正の関連を有することが示されており(Tortosa他、Neurosci., 1, 33~43, 1993)、しかし別の研究では、パルプ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において選択的易損性であることが示唆された(Brady他、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により、このCaBPを正常に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欠損(例えば、運動失調)が、これらのニューロンが形態学的に正常であると考えられるという事実にも関わらず示される。この発見は、CaBPが細胞活動パターンにとって必須であることを示唆している(Airaksinen他、PNAS, 94, 1488~93, 1997)。さらに、カルビンジン-D28kを用い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(amyotrophic lateral sclerosis)患者のIgGによって誘導される毒性に対する神経保護作用を有することが示されており(Ho他、PNAS, 93, 6796~801, 1996)、そしてカルビンジン-D28kを用いたトランスフェクションは、PC12細胞が、血清除去、グルタミン酸曝露および神経毒MPP+による毒性から保護されることを示している(McMahon他、Molec. Brain Res., 526, 303~07, 1998)。

【0007】

まとめると、神経変性におけるカルシウム結合タンパク質に対する役割に関する情報がかなり存在する。保護をもたらすCaBPが存在する一方で、選択的易損性を生じさせるCaBPが存在することは確かであるが、ある種のCaBPが種々のニューロン集団内において発現することにより、特定のCaBPの種々の機能的応答がもたらされるかどうかはまだ明らかになっていない。別の観測結果によると、種々のタイプのCNS損傷の重症度はCaBPの見かけのニューロン

保護効力に影響を及ぼし得るということである。すなわち、1つのCaBPにより、軽度の損傷を伴う損傷モデルにおける抵抗性がもたらされ得るが、より重症なCNS損傷におけるCa²⁺増大を緩衝化することができないと考えられる。したがって、様々なCaBPによりCNS損傷プロセスにおいて易損性だけでなく抵抗性がもたらされるという証拠がかなり存在するが、この関与および応答の調節の機構は今後も解明されなければならない。

【0008】

機能的に同定されていない遺伝子(MO25)を含む遺伝子ファミリーが、マウス由来のcDNAライブラリーから最近単離された(Miyamoto他、Mol. Reprod. Dev., 34, 1~7, 1993)。このライブラリーは、初期の胚性マウスから単離されたRNAから構築された。Mo25の予測されるアミノ酸配列により、MO25遺伝子がCa²⁺結合タンパク質との構造的類似性を有し得ること、そして膜貫通ドメインを有し得ないことが明らかにされた。このことは、このタンパク質が未受精卵の細胞質発達に関与し得ることを示している。しかし、このタンパク質の実際の機能は依然として不明のままである。別のMo25様遺伝子がショウジョウバエ(Drosophila)のcDNAライブラリーからクローン化されている(Nozaki他、DNA Cell Biol., 15, 505~09, 1996)。このMo25 cDNAの推定されるアミノ酸配列は、マウスMo25ホモログと69.3%の同一性を有していた。サッカロマイセスセレビジアエ(Saccharomyces cerevisiae)におけるホモログは、カルシニューレンBサブユニット遺伝子に近いオープンリーディングフレームにコードされていた。ごく最近には、別の遺伝子がアスペルギルス(Aspergillus)hym A変異体から単離され(Karos他、Mol. Gen. Genet., 260, 510~521, 1999)、この遺伝子は、酵母、植物、ハエ、蠕虫(worm)、魚類、マウスおよびヒトにおけるホモログに対応することが明らかにされた。Hymタンパク質に対する細胞機能は、記載された生物のいずれにおいてもまだ解明されていない。機能的な寄与が部分的にしか理解されていない多くの他のタンパク質の場合と同様に、薬物発見プロセスは現在、「機能的ゲノミクス」(すなわち、ゲノム

または遺伝子に基づく高処理能生物学)を採用しているので根本的な激しい変化を受けている。この方法は、遺伝子および遺伝子産物を治療標的として同定する手段として、迅速に、「ポジショナルクローニング」に基づいたより初期の方法の代わりになりつつある。表現型、すなわち、生物学的機能または遺伝子的疾患が同定され、その後、これに対する原因遺伝子とその遺伝地図の位置に基づいて突き止められる。

【0009】

機能的ゲノミクスは、高処理能のDNA配列決定技術に、そして今や利用可能な多くの分子生物学データベースから潜在的に注目される遺伝子配列を同定するためのバイオインフォマティクスの様々なツールに大きく頼っている。さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/タンパク質を薬物発見の標的として同定して特徴付けることが引き続き求められている。新しいヒトANIC-BP様タンパク質スプライス変異体およびそれをコードするポリヌクレオチドの発見は、生殖障害、免疫学的障害、小胞転送障害、神経系障害、発達障害および新生物形成による障害の診断、処置および防止において有用である新しい組成物を提供することによってこの分野における必要性を満たしている。

【0010】

(発明の概要)

本発明は、新しいヒトANIC-BP様タンパク質スプライス変異体の発見に関し、詳細にはANIC-BP-1BポリペプチドおよびANIC-BP-1Bポリヌクレオチド、組換え体およびその製造法に関する。そのようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、発作および急性頭部外傷、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症ならびに脊髄損傷(これらに限定されない)を含むいくつかの疾患(以降、「本発明の疾患」と呼ばれる)を処置する方法に関連して注目されている。さらなる態様において、本発明は、本発明によって提供される材料を使用してアゴニストおよびアンタゴニスト(例えば、阻害剤)を同定するための方法、ならびに同定された化合物を用いて、ANIC-BP-1Bの不均衡に関連する状態を処置するための方法に関する。さらにさらなる態様において、本発明は、ANIC-BP-1Bの不適切な活性およびレベルに関連する疾

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の態様において、本発明はANIC-BP-1Bポリペプチドに関する。そのようなポリペプチドには下記が含まれる。

【0012】

(a) 配列番号1の配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる単離されたポリペプチド；

(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む単離されたポリペプチド；

(c) 配列番号2のポリペプチド配列を含む単離されたポリペプチド；

(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されたポリペプチド；

(e) 配列番号2のポリペプチド配列；および

(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の同一性指標を有するポリペプチド配列を有するか、または含む単離されたポリペプチド；

(g) (a) ~ (f) におけるそのようなポリペプチドのフラグメントおよび変異体。

【0013】

本発明のポリペプチドは、ANIC-BPファミリーのポリペプチドのメンバーであると考えられる。それらは、ANIC-BPと呼ばれるこのファミリーの最近に記載された遺伝子メンバーが、mRNAのディファレンシャルディスプレイ技術を用いて発見されたように、頭部外傷のラットモデルにおいてアップレギュレーションされることが見出されたために興味もたれる。この変異体タンパク質は新規な薬物標的として役立ち得る。

【0014】

ANIC-BP-1Bの生物学的性質は、これ以降、「ANIC-BP-1B

の生物学的活性」または「ANIC - BP - 1 B活性」と呼ばれる。好ましくは、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つのANIC - BP - 1 Bの生物学的活性を示す。

【0015】

本発明のポリペプチドには、すべての対立遺伝子形態およびスプライス変異体を含む前記ポリペプチドの変異体もまた含まれる。そのようなポリペプチドは、挿入、欠失、および保存的または非保存的であり得る置換、またはそれらの任意の組合せによって基準ポリペプチドとは異なる。特に好ましい変異体は、いくつかのアミノ酸、例えば、50個～30個、30個～20個、20個～10個、10個～5個、5個～3個、3個～2個、2個～1個、または1個のアミノ酸が、任意の組み合わせで挿入、置換または欠失されている変異体である。

【0016】

本発明のポリペプチドの好ましいフラグメントには、配列番号2のアミノ酸配列に由来する少なくとも30個、50個または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、あるいは配列番号2のアミノ酸配列から、少なくとも30個、50個または100個の連続したアミノ酸が短縮化または欠失しているアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、ANIC - BP - 1 Bの生物学的活性を媒介する生物学的に活性なフラグメントである。これには、類似する活性また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低下しているフラグメントが含まれる。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そのようなフラグメントも好ましい。

【0017】

本発明のポリペプチドのフラグメントは、対応する全長型ポリペプチドをペプチド合成によって製造するために用いることができる。したがって、これらの変異体は、本発明の全長型ポリペプチドを製造するための中間体として用いることができる。本発明のポリペプチドは、「成熟型」タンパク質の形態であってもよく、あるいは前駆体または融合タンパク質などのより大きなタンパク質の一部であってもよい。分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、精製を助ける配列（例

例えば、多数のヒスチジン残基)、あるいは組換え産生時の安定性に必要なさらなる配列を含有するさらなるアミノ酸配列を含むことは、多くの場合、好都合である。

【0018】

本発明のポリペプチドは、任意の好適な方法によって、例えば、天然に存在する提供源から、発現システム(下記参照)を含む遺伝子操作された宿主細胞から単離することによって、あるいは例えば、自動化されたペプチド合成機を使用する化学合成によって、あるいはそのような方法の組み合わせによって調製することができる。そのようなポリペプチドを調製するための手段はこの分野では十分に理解されている。

【0019】

さらなる態様において、本発明はANIC-BP-1Bポリヌクレオチドに関する。そのようなポリヌクレオチドには下記が含まれる。

【0020】

(a) 配列番号1のポリヌクレオチド配列に対する同一性が少なくとも95%、96%、97%、98%または99%であるポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド;

(b) 配列番号1のポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド;

(c) 配列番号1のポリヌクレオチドに対する同一性が少なくとも95%、96%、97%、98%または99%である単離されたポリヌクレオチド;

(d) 配列番号1の単離されたポリヌクレオチド;

(e) 配列番号2のポリペプチド配列に対する同一性が少なくとも95%、96%、97%、98%または99%であ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む単離されたポリヌクレオチド;

(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む単離されたポリヌクレオチド;

(g) 配列番号2のポリペプチド配列に対する同一性が少なくとも95%、96%、97%、98%または99%であ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されたポリヌクレオチド;

(h) 配列番号2のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド；

(i) 配列番号1のポリヌクレオチド配列と比較した場合、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を有するか、または含む単離されたポリヌクレオチド；

(j) 配列番号2のポリペプチド配列と比較した場合、0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指標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、または含む単離されたポリヌクレオチド；および上記ポリヌクレオチドのフラグメントおよび変異体であるポリヌクレオチド、あるいは上記ポリヌクレオチドに対してその全長にわたって相補的であるポリヌクレオチド。

【0021】

本発明のポリヌクレオチドの好ましいフラグメントには、配列番号1の配列に由来する少なくとも15個、30個、50個または100個の連続したヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド、あるいは配列番号1の配列から、少なくとも30個、50個または100個の連続したヌクレオチドが短縮化または欠失している配列を含む単離されたポリヌクレオチドが含まれる。

【0022】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体には、スプライス変異体、対立遺伝子変異体、および1つまたは複数の単一ヌクレオチド多型(SNP)を含むポリヌクレオチドを含む多型体が含まれる。

【0023】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号2のアミノ酸配列を含み、かついくつかのアミノ酸残基、例えば、50個~30個、30個~20個、20個~10個、10個~5個、5個~3個、3個~2個、2個~1個、または1個のアミノ酸残基が、任意の組み合わせで置換、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また含まれる。

【0024】

さらなる態様において、本発明は、本発明のDNA配列のRNA転写物である

ポリヌクレオチドを提供する。したがって、下記のRNAポリヌクレオチドが提供される。

【0025】

(a) 配列番号2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含むRNAポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1のDNA配列のRNA転写物を含むRNAポリヌクレオチド；または

(d) 配列番号1のDNA配列のRNA転写物であるRNAポリヌクレオチド；ならびにそれらに対して相補的であるRNAポリヌクレオチド。

【0026】

配列番号1のポリヌクレオチド配列は、HymA (Nozaki他、DNA Cell Biol.、15、505~09、1996)、Mo25 (Karos他、Mol. Gen Genet.、260、510~521、1999)およびANIC-BPとの相同性を示す。ANIC-BPタンパク質とANIC-BP-1Bタンパク質(配列番号2)とのアミノ酸配列の比較を行い、これにより、これらの分子のC端部分(配列番号2のアミノ酸位315~338)がかなり異なることが示される。

【0027】

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の配列をコードするポリペプチドと同一で有り得るか、あるいは遺伝暗号の重複性(縮重性)の結果として配列番号2のポリペプチドを同様にコードする、配列番号1とは異なる配列であり得る。配列番号2のポリペプチドは、ANIC-BPとの相同性および/または構造的類似性を有するカルシウム結合タンパク質ファミリーの他のタンパク質との関連性を有する。

【0028】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に、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する生物学的な機能/性質を有することが予想される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは少なくとも1つのANIC - BP - 1B活性を有する。

【0029】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒト単球の活性化された細胞のmRNAに由来するcDNAライブラリーから標準的なクローニング技術およびスクリーニング技術を使用して得ることができる(例えば、Sambrook他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989)を参照のこと)。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノムDNAライブラリーなどの天然の供給源から得ることができ、あるいはよく知られている技術および市販の技術を使用して合成することができる。

【0030】

本発明のポリヌクレオチドが本発明のポリペプチドの組換え製造に使用される場合、ポリヌクレオチドは、成熟型ポリペプチド自身のコード配列、あるいはリーダー配列もしくは分泌配列、プレタンパク質配列もしくはプロタンパク質配列もしくはプレプロタンパク質配列、または他の融合ペプチド部分をコードするコード配列などの他のコード配列と読み枠を合わせた成熟型ポリペプチドのコード配列を含むことができる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカ配列をコードさせることができる。本発明のこの態様のいくつかの好ましい実施形態において、マーカ配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)において提供され、そしてGentz他、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、あるいはHAタグである。ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳配列、スプライシングシグナルおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、ならびにmRNAを安定化させる配列などの5'非コード配列および3'非コード配列を含有し得る。

【0031】

配列番号1のポリヌクレオチド配列に対して同一であるか、または十分な同一性を有するポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノム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)に対するプライマーとして使用することができる。そのような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全長型cDNAおよびゲノムクローンを単離するために、そして配列番号1に対する大きな配列類似性(典型的には、少なくとも95%の同一性)を有する他の遺伝子(ヒト供給源に由来するパラログならびにヒト以外の種に由来するオルソログおよびパラログをコードする遺伝子を含む)を単離するために使用することができる。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ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドを含み、そして少なくとも100ヌクレオチドまでとはいかなくても、少なくとも50ヌクレオチドを有し得る。特に好ましいプローブは、30個から50個の間のヌクレオチドを有する。特に好ましいプライマーは、20個から25個の間のヌクレオチドを有する。

【0032】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(ヒト以外の種に由来するホモログを含む)は、配列番号1の配列または好ましくは少なくとも15ヌクレオチドのそのフラグメントを有する標識されたプローブを用いてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のもとでライブラリーをスクリーニングするステップ;および前記ポリヌクレオチド配列を含有する全長型cDNAクローンおよびゲノムクローンを単離するステップを含む方法によって得ることができる。そのようなハイブリダイゼーション技術は当業者には十分に知られている。好ましいストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸および20マイクログラム/mlの変性させた剪断サケ精子DNAを含む溶液において42℃で一晩インキュベーションし、その後、0.1×SSCにおいて約65℃でフィルタを洗浄することが含まれる。したがって、本発明はまた、配列番号1の配列または好ましくは少なくとも15ヌクレオチドのそ

のフラグメントを有する標識されたプローブを用いてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のもとでライブラリーをスクリーニングすることによって得られる単離されたポリヌクレオチド、好ましくは少なくとも100ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有する単離されたポリヌクレオチドをも含む。

【0033】

当業者は、多くの場合において、ポリペプチドをコードする領域が5'末端に至るまで必ずしも完全に伸長していない点で、単離されたcDNA配列が不完全であることを理解している。これは、第1鎖cDNA合成のときにmRNAテンプレートのDNAコピーを完成させることができない逆転写酵素の結果である。すなわち、固有的に低い「プロセシング能」（重合化反応のときに酵素がテンプレートに結合したままにする能力の大きさ）を有する酵素の結果である。

【0034】

全長型cDNAを得るために、あるいは短いcDNAを伸長させるために利用することができ、かつ当業者に十分に知られている方法がいくつかある。例えば、cDNA端の迅速な増幅(RACE)方法に基づく方法がある(例えば、Frohman他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85、8998~9002、1988を参照のこと)。例えば、Marathon(登録商標)技術(Clontech Laboratories Inc.)によって例示されるこの技術の近年の改変により、より長いcDNAに対する探索が著しく単純化されている。Marathon(登録商標)技術において、cDNAが、選ばれた組織から抽出されたmRNAと、両端に連結された「アダプター」配列とから調製される。その後、核酸増幅(PCR)が、遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーおよびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組合せを使用してcDNAの「失われている」5'端を増幅するために行われる。その後、PCR反応が、「ネスティッド」プライマー、すなわち、増幅産物の内部にアニーリングするように設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列においてさらに3'側にアニーリングするアダプター特異的プライマー、および既知の遺伝子配列においてさらに5'側にアニーリングする遺伝子特異的プライマー)を使用して繰り返される。その後、この反応の生成物がDNA配列決定に

よって分析され得る。全長型のcDNAは、完全な配列を得るために、既存のcDNAに生成物を直接結合させること、あるいは5'プライマーの設計のための新しい配列情報を使用して別の全長PCRを行うことのいずれかによって構築され得る。

【0035】

本発明の組換えポリペプチドは、発現システムを含む遺伝子操作された宿主細胞からこの分野で十分に知られている方法によって調製することができる。したがって、さらなる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチド（1つまたは複数）を含む発現システム、そのような発現システムで遺伝子操作されている宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの製造に関する。無細胞翻訳システムもまた、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用してそのようなタンパク質を製造するために用いることができる。

【0036】

組換え製造のために、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドに対する発現システムまたはその一部を取り込むように遺伝子操作され得る。ポリヌクレオチドは、Davis他、Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrook 他 (同上) などの多くの標準的な実験室マニュアル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-デキストラン媒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、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプ負荷、弾道学的導入または感染が含まれる。

【0037】

適切な宿主の代表的な例には、ストレプトコッカス属細胞、スタフィロコッカス属細胞、大腸菌細胞、ストレプトミセス属細胞および枯草菌細胞などの細菌細胞；酵母細胞およびアスペルギルス属細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ (Drosophila) S2細胞およびSpodoptera Sf9細胞などの昆虫細胞；CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、3T3細胞

胞、BHK細胞、HEK293細胞および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。

【0038】

非常に様々な発現システムを使用することができる。例えば、染色体、エピソームおよびウイルスに由来するシステム、例えば、細菌プラスミドに由来するベクター、バクテリオファージに由来するベクター、トランスポゾンに由来するベクター、酵母エピソームに由来するベクター、挿入エレメントに由来するベクター、酵母染色体エレメントに由来するベクター、バキュロウイルス、パポバウイルス(SV40など)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、偽狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルスに由来するベクター、ならびに、プラスミドおよびバクテリオファージの遺伝子エレメントに由来するベクターなどのそれらの組合せに由来するベクター(コスミドおよびファージミドなど)を使用することができる。これらの発現システムは、発現を生じさせるだけでなく、発現を調節する制御領域を含有することができる。一般に、宿主においてポリペプチドを産生させるためにポリヌクレオチドを維持し、または伝搬させ、または発現させることができるシステムまたはベクターはどれも使用することができる。適切なポリヌクレオチド配列を、例えば、Sambrook他(同上)に示されている技術などの様々なよく知られている日常的な技術のいずれかによって発現システムに挿入することができる。適切な分泌シグナルを、小胞体の内腔、周辺腔または細胞外環境に翻訳されたタンパク質を分泌させるために、所望するポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは、ポリペプチドに対して内因性であってもよく、あるいは異種のシグナルであってもよい。

【0039】

本発明のポリペプチドをスクリーニングアッセイにおける使用のために発現させる場合、ポリペプチドを細胞表面に産生させることが一般には好ましい。この場合、細胞を、スクリーニングアッセイにおいて使用される前に集めることができる。ポリペプチドが培地中に分泌される場合には、ポリペプチドの回収および精製を行うために培地を回収することができる。細胞内に産生される場合には、ポリペプチドを回収する前に細胞を最初に溶解しなければならない。

【0040】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、アニオン交換クロマトグラフィ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、アフィニティークロマトグラフィ、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十分に知られている方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィが精製のために用いられる。ポリペプチドが細胞内合成、単離および/または精製のときに変性した場合には、タンパク質をリフォールディングさせるために十分に知られている技術を用いて、活性な立体配座を再生させることができる。

【0041】

本発明のポリヌクレオチドは、関連する遺伝子における変異を検出することによって診断試薬として使用することができる。cDNA配列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徴付けられ、機能不全に関連している遺伝子の変異形態を検出することにより、その遺伝子の少なすぎる発現、過剰発現あるいは変化した空間的または時間的な発現から生じる疾患の診断またはそのような疾患に対する感受性の診断の一助になり得るか、または規定し得る診断ツールが提供される。遺伝子に変異を有する個体は、この分野で十分に知られている様々な技術によってDNAレベルで検出され得る。

【0042】

診断に必要な核酸は、被験体の細胞から、例えば、血液、尿、唾液、組織生検体または解剖体などから得ることができる。ゲノムDNAは、検出のために直接使用することができ、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使用することによって酵素的に増幅することができる。RNAまたはcDNAもまた同様な様式で使用することができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較して増幅産物のサイズにおける変化によって検出することができる。点変異は、増幅されたDNAをANIC-BP-1Bの標識されたヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションさせることによって同定することができる。完全に一致する配列は、RNase消化によって、あるいは融解温度におけ

る差によってミスマッチした二重鎖から区別することができる。DNA配列の違いはまた、変性剤の存在下または非存在下でのゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化によって、あるいは直接的なDNA配列決定によって検出することができる(例えば、Myers他、Science、(1985)230:1242を参照のこと)。特定の位置における配列の変化もまた、RNase保護または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な切断方法によって明らかにされ得る(Cotton他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、(1985)85:4397~4401を参照のこと)。

【0043】

ANIC-BP-1Bのポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを、例えば、遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うために構築することができる。そのようなアレイは、好ましくは、高密度のアレイまたはグリッドである。アレイ技術法は十分に知られており、そして一般的な適用性を有し、遺伝子発現、遺伝子連鎖および遺伝子変動性を含む分子遺伝学における様々な問題を検討するために使用することができる(例えば、M. Chee他、Science、274、610~613(1996)およびそれに引用されている他の参考文献を参照のこと)。

【0044】

異常に低下しているか、または異常に増大しているポリペプチドまたはmRNAの発現レベルの検出もまた、本発明の疾患に対する被験体の感受性を診断または測定するために使用することができる。低下または増大した発現は、ポリヌクレオチドを定量することに関してこの分野で十分に知られている方法のいずれかを使用して、例えば、核酸増幅(例えば、PCR、RT-PCR)、RNase保護、ノーザンブロットおよび他のハイブリダイゼーション法などを使用して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における本発明のポリペプチドなどのタンパク質のレベルを決定するために使用され得るアッセイ技術は当業者には十分に知られている。そのようなアッセイ方法には、放射免疫アッセイ、競合的結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0045】

したがって、別の態様において、本発明は、下記を含む診断キットに関する。

【0046】

(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フラグメントまたはそのRNA転写物；

(b) (a)のヌクレオチド配列に対して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フラグメント；あるいは

(d) 本発明のポリペプチドに対する抗体、好ましくは、配列番号2のポリペプチドに対する抗体。

【0047】

任意のそのようなキットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)は実質的な成分を含み得ることが理解される。そのようなキットは、疾患または疾患に対する感受性、中でも特に本発明の疾患を診断する際に有用である。

【0048】

本発明のポリヌクレオチド配列は染色体局在化研究に有益である。配列は、個々のヒト染色体における特定の位置に対して特異的に標的化され、かつ特定の位置とハイブリダイゼーションし得る。関連する配列を染色体に本発明に従ってマッピングすることは、そのような配列を遺伝子関連疾患と関連させる際の重要な最初のステップである。配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上における配列の物理的な位置を遺伝地図データと関連させることができる。そのようなデータは、例えば、V. McKusick、ヒトにおけるメンデル遺伝(Mendelian Inheritance in Man)において見出される(これはJohns Hopkins大学Welch Medical Libraryからオンラインで得ることができる)。遺伝子と、同じ染色体領域にマッピングされている疾患との関係が、その後、連鎖分析(物理的に隣り合う遺伝子の同時遺伝)によって同定される。ゲノム配列(遺伝子フラグメントなど)に関する正確なヒト染色体局在化を放射ハイブリッド(RH)マッピングを使用して決定することができる(Walter, M., Spillet, D.

、Thomas, P., Weissenbach, J. および Goodfellow, P., (1994)、ゲノム全体の放射ハイブリッドマップを構築するための方法 (A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes)、Nature Genetics、7、22~28)。多数のRHパネルを Research Genetics (Huntsville, AL, 米国) から得ることができる。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)。このパネルを使用して遺伝子の染色体位置を決定するために、93個のPCRが、RH DNAについて目的とする遺伝子から設計されたプライマーを使用して行われる。これらのDNAはそれぞれが、ハムスターのバックグラウンド (ヒト/ハムスターのハイブリッド細胞株) に維持されたランダムなヒトゲノムフラグメントを含有する。これらのPCRにより、目的とする遺伝子のPCR産物の存在または非存在を示す93個のスコアが得られる。これらのスコアは、知られている位置のゲノム配列に由来するPCR産物を使用して作製されたスコアと比較される。この比較は、<http://www.genome.wi.mit.edu>において行われる。

【0049】

本発明のポリヌクレオチド配列はまた、組織発現研究に対する有益なツールである。そのような研究により、本発明のポリヌクレオチドの発現パターンの決定が可能になり、これにより、コードされたポリペプチドの組織内の発現パターンに関する指標が、それらをコードするmRNAを検出することによってもたらされ得る。使用される技術は、この分野では十分に知られており、cDNAマイク

ロアレイハイブリダイゼーション (S chena 他、S c i e n c e、270、467~470、1995およびShal on 他、G e n o m e R e s、6、639~645、1996) などの、グリッドに配置されたクローンに対するインシトゥ (i n s i t u) ハイブリダイゼーション技術、およびPCRなどのヌクレオチド増幅技術を含む。好ましい方法は、Perkin Elmer から得られるTAQMAN (登録商標) 技術を使用する。これらの研究から得られる結果は、生物におけるポリペプチドの正常な機能の指標を提供する。さらに、mRNAの正常な発現パターンと、同じ遺伝子の別の形態 (例えば、潜在的または調節的な変異をコードするポリペプチド内の変化を有する形態) によってコードされるmRNAの発現パターンとの比較研究は、本発明のポリペプチドの役割に対する有益な洞察を提供し得るか、または疾患におけるその不適切な発現の役割に対する有益な洞察を提供し得る。そのような不適切な発現は、時間的、空間的または単に量的な性質であり得る。本発明のポリペプチドは、ヒト単球の活性化された細胞において発現している。

【0050】

本発明のさらなる態様は抗体に関する。本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントあるいはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的である抗体を産生させるための免疫原として使用することができる。用語「免疫特異的」は、抗体が、先行技術における他の関連するポリペプチドに対するその親和性よりも実質的に大きな親和性を本発明のポリペプチドに対して有することを意味する。

【0051】

本発明のポリペプチドに対して生じる抗体は、日常的なプロトコルを使用して、ポリペプチドまたはエピトープ含有フラグメントまたは細胞を動物 (好ましくは、非ヒト動物) に投与することによって得ることができる。モノクローナル抗体を調製するために、連続的な細胞株培養物によって産生される抗体を提供する技術はどれも使用することができる。例には、ハイブリドーマ技術 (K o h l e r , G . およびM i l s t e i n , C .、N a t u r e (1975) 256: 495~497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (t h e t

rioma technique, the human B-cell hybridoma technique) (Kozbor 他、Immunology Today (1983) 4:72)、およびEBVハイブリドーマ技術(Cole 他、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、77~96、Alan R. Liss, Inc.、1985)が含まれる。

【0052】

米国特許第4,946,778号に記載されている抗体などの単鎖抗体を製造するための技術もまた、本発明のポリペプチドに対する単鎖抗体を製造するために適応させることができる。また、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使用して、ヒト化抗体を発現させることができる。

【0053】

上記に記載された抗体は、ポリペプチドを発現するクローンを単離または同定するために、あるいはアフィニティクロマトグラフィによってポリペプチドを精製するために用いることができる。本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、特に本発明の疾患を処置するために用いることができる。

【0054】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドはまたワクチンとして使用することができる。したがって、さらなる態様において、本発明は、哺乳動物における免疫学的応答を誘導するための方法に関する。この方法は、抗体応答および/またはT細胞免疫応答(例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞傷害性T細胞を含む)を生じさせるために、そして前記動物の疾患からの保護を、その疾患が個体において既に確立されているか否かに関わらず生じさせるために適切な本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含む。哺乳動物における免疫学的応答はまた、本発明の疾患から前記動物を保護する抗体を産生させるそのような免疫学的応答を誘導するために、ポリヌクレオチドの発現を行わせ、かつポリペプチドをコードするベクターによって本発明のポリペプチドを*in vivo*で送達することを含む方法によって誘導され得る。そのようなベクターを投与する1つの方法は、粒子またはそれ以外のものにおけるコーティング物として所望

する細胞内にベクターを促進して入れることによる。そのような核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾型核酸またはDNA/RNAハイブリッドを含むことができる。使用する場合、ワクチン、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、通常、ワクチン配合物（組成物）として提供される。配合物はさらに、好適なキャリアを含むことができる。ポリペプチドは胃において分解され得るので、ポリペプチドは、好ましくは非経口的に投与される（例えば、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射または皮内注射）。非経口投与に好適な配合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および配合物を接種者の血液と等張性にする溶質を含有し得る水性および非水性の無菌注射液；ならびに懸濁剤または増粘剤を含み得る水性および非水性の無菌懸濁剤が含まれる。配合物は、単位用量容器または多回用量容器で、例えば、密封されたアンプルおよびバイアルで提供することができ、そして使用直前に無菌の液体キャリアを添加することだけを必要とする凍結乾燥状態で保存することができる。ワクチン配合物はまた、この分野で知られている水中油型システムおよび他のシステムなどの、配合物の免疫原性を増強するアジュバントシステムを含むことができる。投薬量はワクチンの比活性に依存し、日常的な実験によって容易に決定することができる。

【0055】

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、本明細書中前記に記載された本発明の疾患に関連する1つまたは複数の生物学的機能を有する。したがって、ポリペプチドの機能またはレベルを刺激また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、さらなる態様において、本発明は、ポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害する化合物を同定するための化合物のスクリーニング方法を提供する。そのような方法により、本明細書中前記に記載されているように本発明のそのような疾患に対する治療目的および予防目的のために用いることができるアゴニストまたはアンタゴニストが同定される。化合物は、様々な供給源から、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリー、化学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。そのようにして同定されたそのようなアゴニストまたはアンタゴニストは、天然または修飾された基質、リガンド、受容体、酵素などであり、場合により、ポ

リペプチド；その構造的または機能的な模倣体（Coligan他、Current Protocols in Immunology 1(2)：5章(1991)を参照のこと）あるいは小分子であり得る。

【0056】

スクリーニング方法では、ポリペプチドに対する候補化合物の結合、あるいはポリペプチドまたはその融合タンパク質を含有する細胞または膜に対する候補化合物の結合が、候補化合物に直接的または間接的に結合している標識によって単純に測定され得る。あるいは、スクリーニング方法は、標識された競合剤（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）に対抗する候補化合物のポリペプチドに対する競合的な結合を（定性的または定量的に）測定または検出することを含み得る。さらに、これらのスクリーニング方法では、ポリペプチドの活性化または阻害によって発生するシグナルを候補化合物が生じさせるかどうかを、ポリペプチドを含有する細胞に適切な検出システムを使用して調べることができる。活性化の阻害は、一般には既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして候補化合物が存在することによるアゴニストによる活性化に対する作用が観測される。さらに、スクリーニング方法は、候補化合物を、本発明のポリペプチドを含有する溶液と混合して、混合物を形成させるステップ、その混合物におけるANIC-BP-1B活性を測定するステップ、およびその混合物のANIC-BP-1B活性を、候補化合物を含有しないコントロール混合物と比較するステップを単に含み得る。

【0057】

本発明のポリペプチドは、従来の低い能力のスクリーニング方法において、そしてまた高処理能スクリーニング（high-throughput screening）（HTS）形式において用いることができる。そのようなHTS形式には、96ウエルマイクロタイタープレートおよびより最近には384ウエルマイクロタイタープレートがよく確立された使用だけでなく、Schullick他、Anal Biochem.、246、20～29、（1997）により記載されるナノウエル法などの最近現れた方法もまた含まれる。

【0058】

本明細書中前記に記載されているように、Fc部分およびANIC-BP-1 Bポリペプチドから作製される融合タンパク質などの融合タンパク質もまた、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高処理能スクリーニングアッセイのために使用することができる(D. Bennett他、J Mol Recognition、8:52~58(1995)及びK. Johanson他、J Biol Chem、270(16):9459~9471(1995)を参照のこと)。

【0059】

スクリーニング技術

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、mRNAおよびポリペプチドの産生に対する添加された化合物の細胞内における作用を検出するためのスクリーニング方法を組み立てるために使用することができる。例えば、ELISAアッセイを、この分野で知られている標準的な方法によってモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を使用し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ために構築することができる。これは、好適に操作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し得る薬剤または増強し得る薬剤(これらは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)を発見するために使用することができる。

【0060】

本発明のポリペプチドは、受容体が存在する場合には、この分野で知られている標準的な受容体結合技術によって膜結合型受容体または可溶性受容体を同定するために使用することができる。これらには、ポリペプチドが放射性同位体(例えば、¹²⁵I)で標識され、化学修飾され(例えば、ビオチン化され)、あるいは検出または精製に好適なペプチド配列に融合させられ、そして推定される受容体の供給源(細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液)とインキュベーションされるリガンド結合アッセイおよび架橋アッセイが含まれるが、これらに限定されない。他の方法には、表面プラズモン共鳴および分光測定法などの生物物理学的技術が含まれる。これらのスクリーニング方法はまた、ポリペプチドのその受容体に対する結合と競合するポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニスト

を、それらが存在する場合に同定するために使用することができる。そのようなアッセイを行うための標準的な方法はこの分野では十分に理解されている。

【0061】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、リガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連する抗体、または特定の場合にはオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、場合により、ポリペプチド、例えば、リガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメント；あるいは本発明のポリペプチドに結合するが、応答を誘発せず、その結果、ポリペプチドの活性が妨げられる小分子が含まれる。

【0062】

スクリーニング方法はまた、トランスジェニック技術およびANIC-BP-1B遺伝子の使用を伴い得る。トランスジェニック動物を構築する技術は十分に確立されている。例えば、ANIC-BP-1B遺伝子を、受精した卵母細胞の雌性前核へのマイクロインジェクションによって、移植前または移植後の胚へのレトロウイルス移入によって、またはエレクトロポレーションなどで遺伝子操作された胚性幹細胞の宿主胚盤胞への注入によって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、動物の遺伝子はその動物のゲノム内においてヒトの等価体によって置き換えられているいわゆる「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、標的の有効性を確認するために、薬物発見プロセスにおいて有用である。この場合、化合物はヒトの標的に対して特異的である。他の有用なトランスジェニック動物は、細胞内の内因性DNA配列によってコードされる、本発明のポリペプチドの動物オルソログの発現が部分的または完全に無効に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に対して標的化され得るか、あるいは技術の限界の結果として特定の細胞または組織でのみに生じ得るか、あるいは動物内のすべての細胞または実質的にすべての細胞において生じ得る。トランスジェニック動物の技術はまた、導入された遺伝子が、本発明のポリペプチドを大量に得るために発現させられる動物全体の発現-クローニングシステムを提供する。

【0063】

上記に記載された方法において使用されるスクリーニングキットは、本発明の

さらなる態様をなす。そのようなスクリーニングキットは下記のものを含む。

【0064】

- (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；

そのようなポリペプチドは、好ましくは配列番号2のポリペプチドである。

【0065】

任意のそのようなキットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)は実質的な成分を含み得ることが理解される。

【0066】

用語集

下記の定義は、本明細書中前記において頻繁に使用されているいくつかの用語の理解を容易にするために提供される。

【0067】

本明細書中に記載されている「抗体」は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、およびヒト化抗体、ならびにFabフラグメントを包含し、Fab発現ライブラリーまたは別の免疫グロブリン発現ライブラリーの生成物を包含する。

【0068】

「単離(された)」は、その自然の状態から「ヒトの手によって」変化していることを意味する。すなわち、自然界に存在する場合、その本来の環境から変化しているか、または取り出されているか、またはその両方であることを意味する。例えば、生きた生物に自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、その自然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、この用語が本明細書中で用いられているように「単離」されている。さらに、形質転換、遺伝子操作によって、または任意の他の組換え方法によって生物に導入されているポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、そのような生物が生存または非生存であるとしても、前記生物内に依然と

して存在している場合でさえ、「単離」されている。

【0069】

「ポリヌクレオチド」は、一般には、任意の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)をいうが、これらは、非修飾型または修飾型のRNAまたはDNAであってもよい。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合であるDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域および二本鎖領域の混合であるRNA、一本鎖またはより典型的には二本鎖であるか、または一本鎖領域および二本鎖領域の混合であるDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が含まれるが、これらに限定されない。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNA、またはRNAとDNAとの両方を含む三重鎖領域をいう。用語「ポリヌクレオチド」はまた、1つまたは複数の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAを含む。「修飾(された)」塩基には、例えば、トリチル化された塩基、およびイノシンなどの非通常型の塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに対して行うことができ、したがって、「ポリヌクレオチド」は、自然界に典型的に見出されるようなポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された形態、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、オリゴヌクレオチドとしばしば呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドを包含する。

【0070】

「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、ペプチド等配電子体)によって互いに連結された2つ以上のアミノ酸を含む任意のポリペプチドをいう。「ポリペプチド」は、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと広く呼ばれる短い鎖、および一般にはタンパク質と呼ばれるそれよりも長い鎖の両方をいう。ポリペプチドは、遺伝子によってコードされる20個のアミノ酸とは異なるアミノ酸を含有することができる。「ポリペプチド」は、翻訳後プロセッシングなどの自然のプロセスあるいはこの分野で十分に知られている化学的な修飾技術のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列を含む。その

ような修飾は、基本的な教本に、そしてより詳細な専門書ならびに数多くの研究文献に十分に記載されている。修飾は、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ル末端を含むポリペプチド内の任意のところに存在させることができる。同じタイプの修飾が所与ポリペプチド内のいくつかの部位に同じ程度または異なる程度で存在し得ることが理解される。また、所与ポリペプチドは多くのタイプの修飾を含有することができる。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝状であってもよく、そして分枝を伴う環状、または分枝を伴わない環状であってもよい。環状ポリペプチド、分枝状ポリペプチドおよび分枝した環状ポリペプチドは、翻訳後の自然のプロセスに由来し得るか、あるいは合成的方法によって作製することができる。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ビオチン化、フラビンの共有結合、ヘム成分の共有結合、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、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、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、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質への転移RNA媒介付加、ならびユビキチン化が含まれる(例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties (タンパク質 - 構造および分子的性質)、第2版、T. E. Creighton、W. H. Freeman and Company、New York、1993; World, F.、翻訳後タンパク質修飾: 全体像および展望 (Post-translational Protein Modification: Perspectives and Prospects)、1~12、Post-translational Covalent Modification of Proteins (タンパク質の翻訳後共有結合修飾)、B. C. Johnson編、Academic Press、New York、1983; Seifter他、「タンパク質修飾および非タンパク質補助因子の分析 (Analysis for

protein modifications and nonprotein cofactors)」、Meth Enzymol、182、626~646、1990及びRattan他、「タンパク質合成：翻訳後修飾およびエージング(Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging)」、Ann N Y Acad Sci、663、48~62、1992を参照のこと)。

【0071】

ポリペプチド配列の「フラグメント」は、基準配列よりも短い、基準ポリペプチドと同じ生物学的な機能または活性を本質的に保持しているポリペプチド配列をいう。ポリヌクレオチド配列の「フラグメント」は、配列番号1の基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列をいう。

【0072】

「変異体」は、基準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、その本質的な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、ヌクレオチド配列が基準ポリヌクレオチドとは異なる。変異体のヌクレオチド配列における変化は、基準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化させることがあり、あるいは変化させないことがある。ヌクレオチドの変化は、下記に議論されているように、基準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、融合および短縮化(末端欠失)をもたらす得る。ポリペプチドの典型的な変異体は、アミノ酸配列が基準ポリペプチドとは異なる。一般に、変化は、基準ポリペプチドおよび変異体の配列が全体的に非常に類似し、そして多くの領域において同一であるように制限される。変異体ポリペプチドおよび基準ポリペプチドは、アミノ酸配列が、1つまたは複数の置換、挿入、欠失の任意の組合せによって異なり得る。置換または挿入されるアミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸残基であってもよく、あるいは遺伝暗号によってコードされるアミノ酸残基でなくてもよい。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および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、対立遺伝子などの自然に存在するものであってもよく、あるいは自然に存在す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天然に存在しない変異体は、変異誘発技術によって、あるいは直接的な合成によって作製することができる。また、1つまたは複数の翻訳後修飾（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もまた変異体として含まれる。実施形態には、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が含まれる。

【0073】

「対立遺伝子」は、ゲノム内の所与遺伝子座に存在する遺伝子の2つ以上の代わりの形態の1つをいう。

【0074】

「多型」は、集団内のゲノムにおける所与の位置でのヌクレオチド配列（関連する場合にはコードされるポリペプチド配列）の変化をいう。

【0075】

「単一ヌクレオチド多型」(SNP)は、集団内においてゲノム内の1つのヌクレオチド位置におけるヌクレオチド変動性が存在することをいう。SNPは、遺伝子内に、あるいはゲノムの遺伝子間領域内に存在し得る。SNPは、対立遺伝子特異的増幅(ASA)を使用してアッセイすることができる。このプロセスには、少なくとも3つのプライマーが必要である。共通プライマーが、アッセイされる多型に対する逆相補で使用される。この共通プライマーは、多型塩基から50bpから1500bpの間であり得る。それ以外の2つ(またはそれ以上)のプライマーは、最後の3'塩基が、多型を構成する2つ(またはそれ以上)の対立遺伝子の1つと一致するように固定されていない点を除いて互いに同一である。その後、2つ(またはそれ以上)のPCR反応がサンプルDNAについて行われる。このとき、それぞれのPCRには共通プライマーおよび1つの対立遺伝子特異的プライマーが使用される。

【0076】

本明細書中で使用されている「スプライス変異体」は、同じゲノムDNA配列

から最初に転写されたRNA分子から産生され、しかし選択的なRNAスプライシングを受けているcDNA分子をいう。選択的なRNAスプライシングは、一般にはイントロンを除くために一次RNA転写物がスプライシングを受けたときに生じる。その結果、それぞれが異なるアミノ酸配列をコードし得る2つ以上のmRNA分子がもたらされる。スプライス変異体の用語はまた、上記のcDNA分子によってコードされるタンパク質をも示す。

【0077】

「同一性」は、配列を比較することによって決定される、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間における関係を反映している。一般に、同一性は、比較されている配列の長さにわたって2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列のそれぞれのヌクレオチド毎またはアミノ酸毎の正確な一致をいう。

【0078】

「%同一性」 - 正確な一致が存在しない配列の場合に、「%同一性」が決定され得る。一般に、比較される2つの配列は、最大の相関が配列間に得られるようにアラインメントされる。これには、アラインメントの程度を高めるために「ギャップ」をいずれか一方の配列または両方の配列に挿入することが含まれ得る。%同一性は、比較されている配列のそれぞれの長さ全体にわたって決定され得る（いわゆる全体的なアラインメント）：これは、同じ長さまたは非常に類似する長さの配列の場合には特に好適である；あるいは、より短い規定された長さにわたって決定され得る（いわゆる局所的アラインメント）：これは、長さが等しくない配列の場合にはより好適である。

【0079】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列の間における関係のより精巧なさらなる尺度である。一般に、「類似性」は、（同一性に関して）比較されている配列のそれぞれに由来する残基の残基対の間における正確な一致だけでなく、正確な一致が存在しない場合には、進化的な基準に基づいて、1つの残基がそれ以外の残基に対する確からしい置換体であるかどうかをも考慮した、残基毎に基づく2つのポリペプチド鎖のアミノ酸間の比較を意味する。この可能性は、2つの配列

の「%類似性」がその後に決定され得る関連した「スコア」を有する。

【0080】

2つ以上の配列の同一性および類似性を比較するための方法はこの分野では十分に知られている。したがって、例えば、ウイスコンシン配列分析パッケージ、バージョン9.1 (Devereux J. 他、Nucleic Acids Res、12、387~395、1984; Genetic Computer Group (Madison, Wisconsin、米国) から入手可能) において利用できるプログラム、例えば、BESTFITプログラムおよびGAPプログラムを用いて、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%類似性を決定することができる。BESTFITは、SmithおよびWatermanの「局所的相同性」アルゴリズム (J Mol Biol、147、195~197、1981、Advances in Applied Mathematics、2、482~489、1981) を使用して、2つの配列間における類似性の最も良い領域を見出す。BESTFITは、長さが類似していない2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列を比較することに対してより適している。このプログラムは、短い方の配列が長い方の配列の一部を表すことを仮定している。比較において、GAPは、NeddllemanおよびWunschのアルゴリズム (J Mol Biol、48、443~453、1970) に従って2つの配列をアラインメントし、これにより「最大の類似性」が見出される。GAPは、ほぼ同じの長さである配列を比較することに対してより適しており、そしてアラインメントが長さ全体にわたって予想される。好ましくは、それぞれのプログラムにおいて使用される「ギャップ加重」および「長さ加重」のパラメーターは、それぞれ、ポリヌクレオチド配列の場合には50および3であり、ポリペプチド配列の場合には12および4である。好ましくは、%同一性および類似性は、比較されている2つの配列が最適にアラインメントされたときに決定される。

【0081】

配列間の同一性及び/または類似性を決定するための他のプログラムもまたこの分野では知られている。例えば、BLASTファミリーのプログラム (Alt

schul S F他、J Mol Biol、215、403~410、1990; Altschul S F他、Nucleic Acids Res.、25:389~3402、1997; National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Bethesda, Maryland, 米国)、www.ncbi.nlm.nih.govにおけるNCBIのホームページからアクセス可能)、及びFASTA (Pearson W R、Methods in Enzymology、183、63~99、1990; Pearson W RおよびLipman D J、Proc Nat Acad Sci USA、85、2444~2448、1988; ウィスコンシン配列分析パッケージの一部として入手可能)。

【0082】

好ましくは、BLOSUM62アミノ酸置換行列 (Henikoff SおよびHenikoff J G、Proc. Nat. Acad Sci. USA、89、10915~10919、1992) が、比較の前にヌクレオチド配列がアミノ酸配列に最初に翻訳される場合を含むポリペプチド配列比較において使用される。

【0083】

好ましくは、プログラムBESTFITが、基準ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列に関する質問ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の%同一性を決定するために使用される。この場合、質問配列および基準配列は最適にアラインメントされており、プログラムのパラメーターは、本明細書中前記に記載されているように設定省略時の既定値に設定されている。

【0084】

「同一性指標」は、候補配列 (ポリヌクレオチドまたはポリペプチド) を基準配列と比較するために使用され得る配列関連性の尺度である。したがって、例えば、基準ポリヌクレオチド配列と比較したときに、例えば0.95の同一性指標を有する候補ポリヌクレオチド配列は、候補ポリヌクレオチド配列が基準配列の各100ヌクレオチドあたり平均して5個までの違いを含み得ることを除いて基準配列と同一である。そのような違いは、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失

、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から選択される。これらの違いは、基準ポリヌクレオチド配列の5'末端位置または3'末端位置、あるいはこれらの末端位置の間の任意のところにおいて、基準配列内のヌクレオチド間に個々に点在して、あるいは基準配列内に1つまたは2つ以上の連続した群で点在して存在し得る。すなわち、基準ポリヌクレオチド配列と比較したときに0.95の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、本明細書中前記に記載されているように、基準配列において100個毎に平均して5個までのヌクレオチドの欠失、置換または挿入がその任意の組合せで存在していてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99について必要に応じて変更して適用される。

【0085】

同様に、ポリペプチドの場合、例えば、基準ポリペプチド配列と比較したときに、0.95の同一性指標を有する候補ポリペプチド配列は、基準配列の各100アミノ酸あたり平均して5個までの違いをポリペプチド配列が含み得ることを除いて基準配列と同一である。そのような違いは、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、保存的置換および非保存的置換を含む置換、または挿入からなる群から選択される。これらの違いは、基準ポリペプチド配列のアミノ末端位置またはカルボキシ末端位置あるいはこれらの末端位置の間の任意のところにおいて、基準配列内のアミノ酸間に個々に点在して、あるいは基準配列内に1つまたは2つ以上の群で点在して存在し得る。すなわち、基準ポリペプチド配列と比較したときに0.95の同一性指標を有するポリペプチド配列を得るためには、本明細書中前記に記載されているように、基準配列において100個毎に平均して5個までのアミノ酸の欠失、置換または挿入がその任意の組合せで存在していてもよい。同じことが、同一性指標の他の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99について必要に応じて変更して適用される。

【0086】

ヌクレオチドまたはアミノ酸の相違数と同一性指標との関係は下記の式で表すことができる。

【0087】

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

式中、

n_a はヌクレオチドまたはアミノ酸の相違数であり、

x_a は配列番号1または配列番号2におけるそれぞれヌクレオチドまたはアミノ酸の総数であり、

I は同一性指標であり、

\cdot は乗算演算子に対する記号であり、

この場合、 x_a と I との非整数の積は最も近い整数に切り捨てられ、その後、その値が x_a から引かれる。

【0088】

「ホモログ」は、基準配列に対する大きな程度の配列関連性を有するポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列を示すためにこの分野で使用されている包括的な用語である。そのような関連性は、本明細書中前記に定義されているように2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することによって定量化され得る。この包括的な用語には、「オルソログ」および「パラログ」の用語が含まれる。「オルソログ」は、別の種におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価体であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。「パラログ」は、機能的に類似している同じ種におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

【0089】

「融合タンパク質」は、2つの関連しない融合された遺伝子またはそのフラグメントによってコードされるタンパク質をいう。様々な例が、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-1Bの場合、融合タンパク質の一部として免疫グロブリンのFc領域を用いることは、Fc-ANIC-BP-1Bを機能的に発現させて、治療に使用されたときのそのような融合タンパク質の薬物動態学的性質を改善するために、そして二量体のFc-ANIC-BP-1Bを形成させるためには好

都合である。Fc-ANIC-BP-1BのDNA構築物は、5'から3'の方向で、分泌カセット(すなわち、哺乳動物細胞からの細胞外への輸送を引き起こすシグナル配列)、融合パートナーとして免疫グロブリンFc領域フラグメントをコードするDNA、およびFc-ANIC-BP-1BをコードするDNAを含む。使用に応じて、機能的なFc側を変異させ、一方、融合タンパク質の残りの部分を変化させないままにすることによって固有的な機能的性質(補体結合、Fc受容体結合)を変化させ得るか、あるいは発現後にFc部分を完全に除き得ることは望ましい。

【0090】

特許および特許出願(これらに限定されない)を含む、本明細書中に引用されているすべての刊行物および参考文献は、個々の刊行物または参考文献のそれぞれが、完全に示されているように本明細書中に参考として組み込まれることが明示的かつ個々に示されているかのように、その全体が参考として本明細書中に組み込まれる。本出願が優先権を主張するすべての特許出願もまた、刊行物および参考文献に関して上記に記載されている様式でその全体が参考として本明細書中に組み込まれる。

【0091】

(さらなる例)

実施例1

外傷性脳損傷モデル

外傷性脳損傷(TBI)に応答してアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされる遺伝子の同定が、側方流体法(lateral fluid method)を用いてラットにおいて研究された。右側頭頂皮質に集中する中程度のTBIを雄性Sprague-Dawleyラットにおいて側方流体衝撃法により誘導した。TBIの5日後、ラットを屠殺して、切開された脳組織をディファレンシャルディスプレイによって分析した。損傷を受けた脳の小脳におけるタンパク質のアップレギュレーションがRT-PCRによって確認された。

【0092】

コントロールのラットには麻酔をして、側頭筋を収縮させたが、開頭手術は行

わなかった。5日間生存させた後、すべてのラットを麻酔して死亡させ、脳を切開して、液体窒素で凍結した。

【0093】

別シリーズのTBIラットを組織化学的染色および免疫組織化学的染色のために使用した。TBIの1週間後、これらのラットを麻酔して、生理食塩水を灌流し、その後、3%パラホルムアルデヒドを灌流した。脳を凍結マイクロソームで冠状面に沿って30 μ mの切片に切断した。

【0094】

実施例2

免疫組織化学

小脳切片を、カルシウム結合タンパク質に対するモノクローナル抗体で標識した。免疫複合体を、アビジン - ビオチン / DAB法を使用して可視化した。陽性のコントロールとして、カルビンジン - D (28 kD) が、小脳プルキンエ細胞の信頼できるマーカーとして使用される。

【0095】

実施例3

インシトゥハイブリダイゼーション

配列番号1から選択されるオリゴデオキシヌクレオチド(センス、アンチセンス)が、当業者には明かな標準的な方法に従って設計される。これらのプローブは、この分野で知られている方法に従って、ラット脳組織切片におけるインシトゥハイブリダイゼーションのために使用される。オートラジオグラフがコダック社のBioMaxフィルムへの5日間の感光の後で可視化される。

【0096】

実施例4

TBIラットからのRNA単離

mRNAディファレンシャルディスプレイが、任意の真核生物細胞におけるmRNAレベルでの変化した遺伝子発現を同定および分析するための方法として開発されている(LiangおよびPardee、Science、257、967、1992)。本発明において、本発明者らはこの方法を使用して、CNS損

傷の分子的作用に対するより良好な洞察を得るために、外傷性脳損傷に应答してアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされる遺伝子を研究した (den Daas 他、アメリカ神経科学会ミーティング、Washington D.C.、米国、1998年)。外傷性脳損傷に対するこの動物モデルは側方流体刺激モデルと呼ばれており、下記のように行われる。脳の右側頭頂皮質に集中する中程度の外傷性脳損傷を雄性 Sprague-Dawley ラットにおいて側方流体衝撃法により誘導した。コントロールのラットには麻酔をして、側頭筋を収縮させたが、開頭手術は行わなかった。5日間生存させた後、ラットを麻酔して死亡させ、脳を切開して、液体窒素で凍結した。脳全体をホモジナイズして、総RNAを単離した (Sambrook 他、1989)。

【0097】

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によって分析した。mRNAの逆転写を、すべての可能な組合せで2つのさらなるヌクレオチド(下流プライマー; 13マー)とともにオリゴdTプライマーを使用して行った。従って、反応がポリ(A)テールの開始で固定される。

【0098】

cDNAの増幅を、同じ3'プライマーと、別のデカマーの任意の5'プライマー(上流プライマー)とを用いて行った。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)で分析した。DNAを銀染色によって可視化した。染色後、ゲルを室温で1時間乾燥した(図1)。示差的に調節されているバンドをゲルから切り出した。DNAを溶出し、再度増幅して、pCR2.1ベクター(Invitrogen、米国)にサブクローン化した。サブクローン化されたフラグメントをサンガー法(Sanger F.、他、PNAS, USA, 74, 5463~5467)によって配列決定して、配列をゲノムデータベースと比較した。得られた遺伝子フラグメントの確認を、逆転写PCR(RT-PCR)を用いて行った。示差的に発現するラットMo25を確認するために、配列を、特異的な19マープライマーおよび21マープライマーを用いたタイタン(Titan)ワンチューブR

T-PCRシステム(Boehringer Mannheim、ドイツ)を用いてRT-PCRによって分析した。コントロール動物およびTBI動物に由来する1 μ gの総RNAをRT-PCRのために使用した。より多くの遺伝子の確認が、ラットMo25に由来するプローブを用いたドットプロット技術と、ヒトMo25に由来するプローブを用いて行われたノーザンプロット分析とを使用して行われた。

【0099】

逆転写PCR(RT-PCR)

示差的に発現する発作誘導によるカルシウム結合タンパク質を確認するために、配列を、特異的な19マープライマーおよび21マープライマーを用いたタイタンワンチューブRT-PCRシステム(Boehringer Mannheim、ドイツ)を使用してRT-PCRによって分析した。コントロール動物およびTBI動物に由来する1 μ gの総RNAをRT-PCRのために使用した。

【0100】

リアルタイムPCR

頭部外傷後のラット脳におけるANIC-BP-1Bの分布を、ABI prism7700配列検出システム(PE、Applied Biosystems、ドイツ)でのリアルタイムTaqMan PCR技術によって調べた。この技術を用いて、mRNAの絶対濃度を高感度で測定することができる。長さが25bpおよび29bpである特別なプライマーと、32マーのTaqManプローブ(レポーター色素:FAM/消光色素:TAMRA)とが設計された。

【0101】

Ca²⁺結合

SDS-PAGEによって分離されたタンパク質をニトロセルロース膜にプロットして、Murayama, K.他(J. Biochem. 95:511~519, 1984)により記載される方法を用いて放射性標識Ca²⁺の結合についてアッセイした。インキュベーション後、過剰な同位体を洗浄して除き、膜をコダック社のXOMAT-TMフィルムに適切な時間感光させた。1つのバンドが結合タンパク質の位置に現れた。結合タンパク質の存在は、結合タンパク質に

対して特異的な抗体を使用し、そしてこの分野で十分に知られているウエスタン
ブロット法によってその抗体を適用することによって確認された。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Merck Patent GmbH
5 <120> Acute neuronal induced binding protein (ANIC-BP-1B)
<130> ANICBP1BIDWS
<140>
10 <141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
15 <210> 1
<211> 1053
<212> DNA
<213> Homo sapiens
20 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1053)
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 tcg 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 gat tgt atg agc agt tcc	960
	Phe Leu Ser Lys Phe Gln Asn Asp Arg Thr Asp Cys Met Ser Ser Ser	
	305 310 315 320	
55	gta ccg acg acg aat tcc cgg gtc gat tta cgc gtt aaa ccg cgg acg	1008
	Val Pro Thr Thr Asn Ser Arg Val Asp Leu Arg Val Lys Pro Arg Thr	
	325 330 335	
60	cgt ggg atc agg gat ttg aag aga cca gct cag caa gaa gct taa	1053
	Arg Gly Ile Arg Asp Leu Lys Arg Pro Ala Gln Gln Glu Ala	
	340 345 350	
55	<210> 2	
	<211> 350	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
60	<400> 2	
	Met Pro Phe Pro Phe Gly Lys Ser His Lys Ser Pro Ala Asp Ile Val	
	1 5 10 15	

	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			
5	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
10					85					90					95	
	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			
15	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
20					165					170					175	
	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		
25	Arg	Phe	Phe	Ser	Glu	Tyr	Glu	Lys	Leu	Leu	His	Ser	Glu	Asn	Tyr	Val
		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
30					245						250				255	
	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			
35	Gln	Pro	Ile	Leu	Asp	Ile	Leu	Leu	Lys	Asn	Gln	Ala	Lys	Leu	Ile	Glu
		290					295					300				
	Phe	Leu	Ser	Lys	Phe	Gln	Asn	Asp	Arg	Thr	Asp	Cys	Met	Ser	Ser	Ser
		305					310				315					320
	Val	Pro	Thr	Thr	Asn	Ser	Arg	Val	Asp	Leu	Arg	Val	Lys	Pro	Arg	Thr
40					325						330				335	
	Arg	Gly	Ile	Arg	Asp	Leu	Lys	Arg	Pro	Ala	Gln	Gln	Glu	Ala		
				340					345					350		

【図面の簡単な説明】

【図1】

示差的に調節されたバンドを損傷側とは反対側の小脳半球に有する代表的なmRNAディファレンシャルディスプレイゲルを示す図である。矢印は、示差的に発現したバンドを示す。

【図2】

5回、10回、15回、20回、25回および30回のそれぞれのサイクルでの、TBI後の小脳におけるラットMo25の270bp遺伝子フラグメントを有するRT-PCRを示す図である。20回、25回および30回のサイクルでL2レーンにおける強い発現に留意すること。

L2：TBIラットの非損傷側部のcDNA；R2：TBIラットの損傷側部の

cDNA。

【図3】

放射性³²Pで標識されたラットMo25の270bp遺伝子フラグメントを用いた、TBI後のラットの小脳mRNAとのドットプロット分析を示す図である。6匹のラット個体を調べた。3匹が処置動物であり、3匹が偽手術動物である。

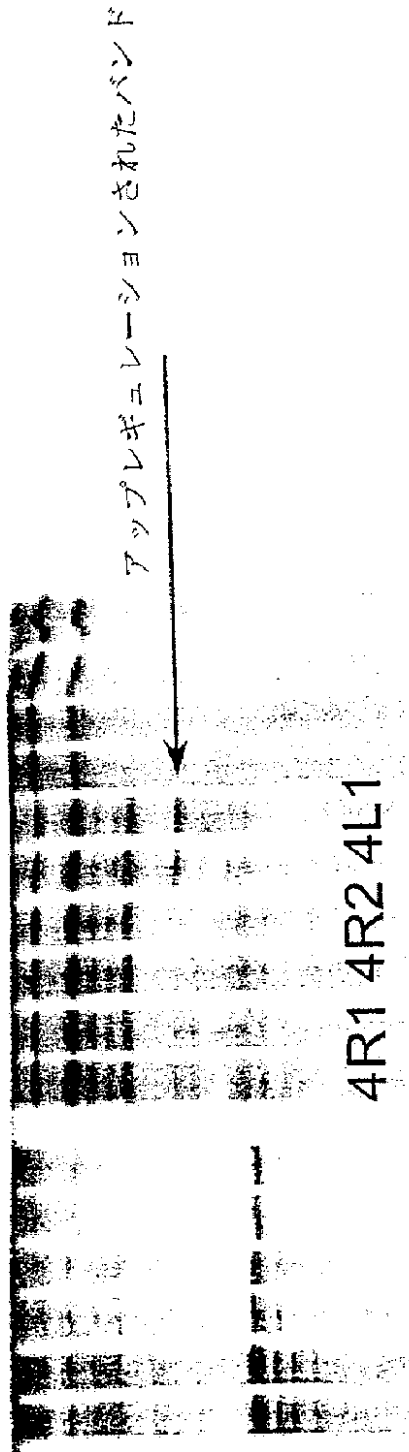
【図4】

放射性³²Pで標識されたラットMo25の270bp遺伝子フラグメントがラットの8組織にハイブリダイゼーションしている多組織ノーザンプロット(Clonotech Laboratories Inc、Palo Alto、CA、米国)を示す図である。

【図5】

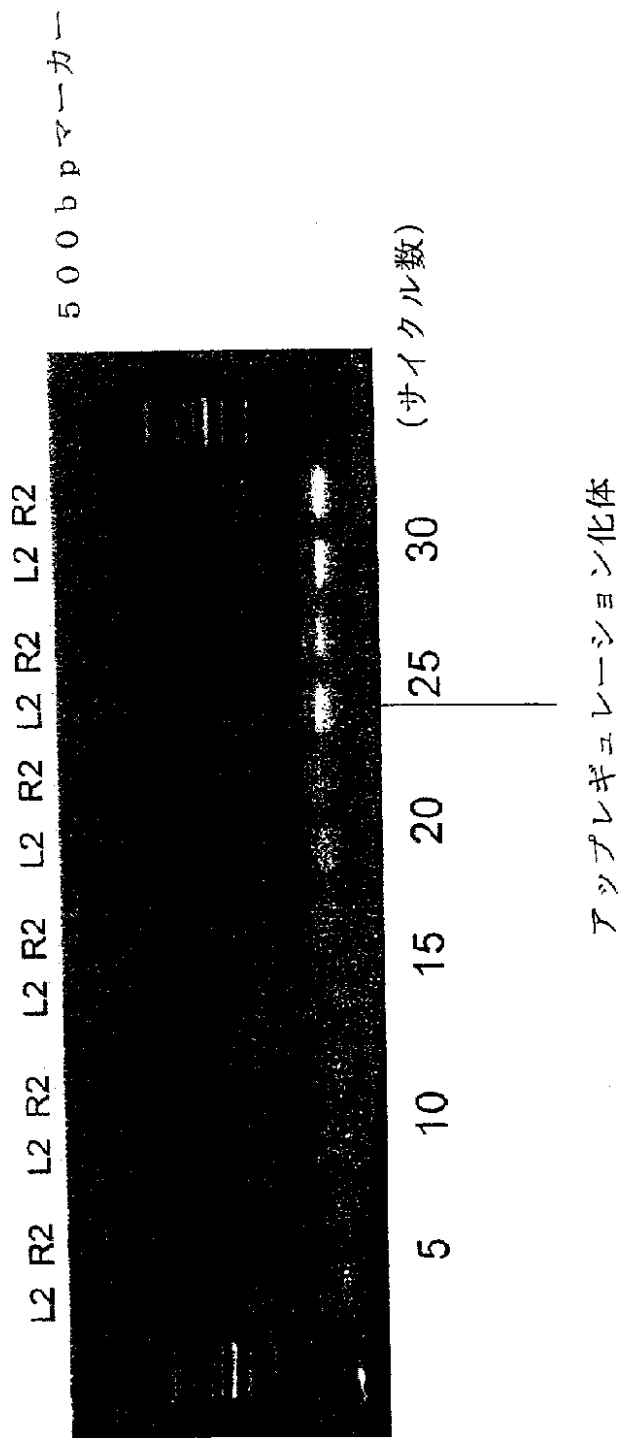
ラット脳切片のin situハイブリダイゼーションを示す図である。SICCBPおよびMo25に対して特異的なセンスプローブおよびアンチセンスプローブが使用されている。有髄神経管(脳梁、視索、中間嗅索、小脳前交連)を輝かす強いシグナルが、アンチセンスプローブを使用してモニターされている。

【図1】

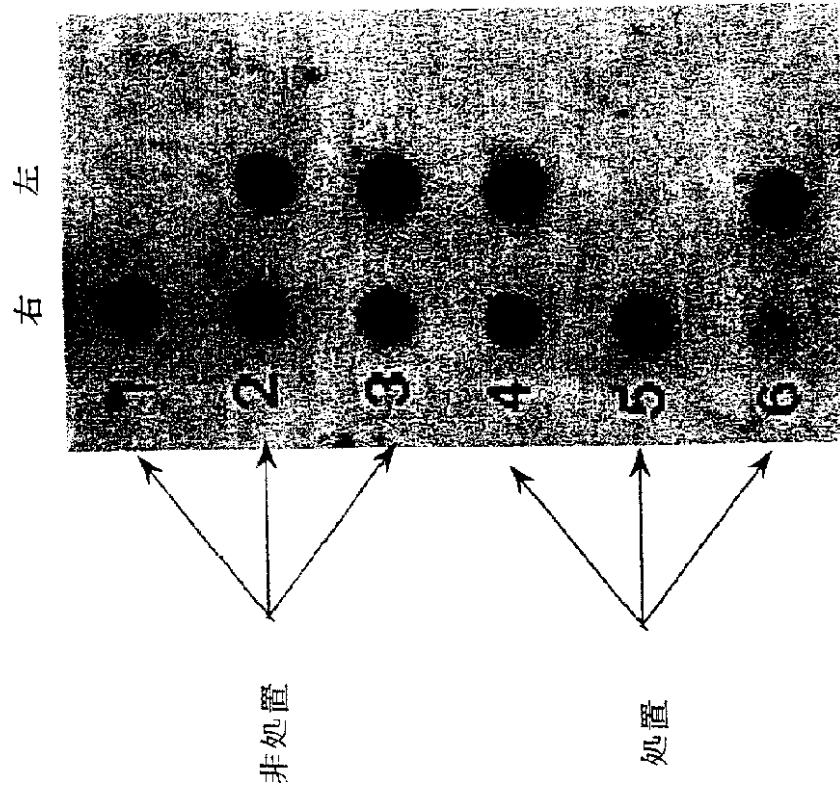


- 4R1: 損傷側処置ラット
- 4R2: 損傷側偽処置ラット
- 4L1: 非損傷側処置ラット

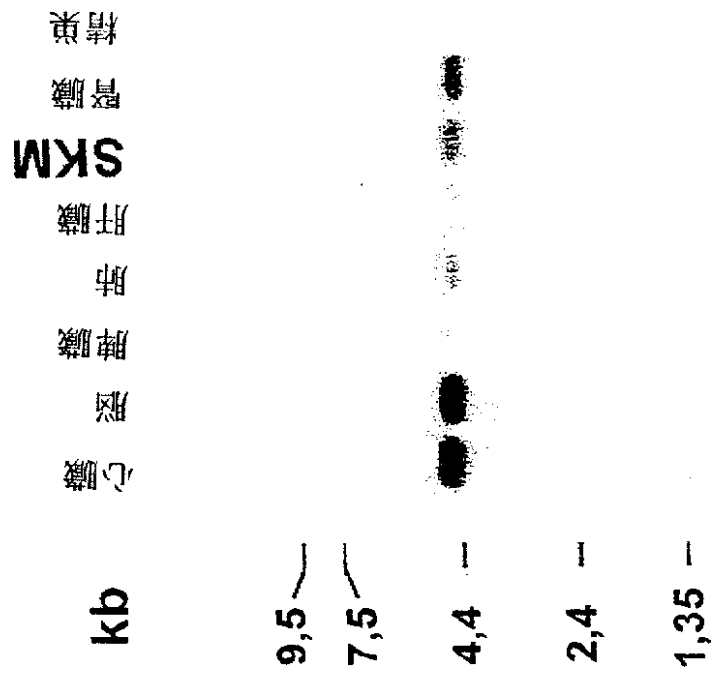
【図2】



【图3】



【图4】



【図5】

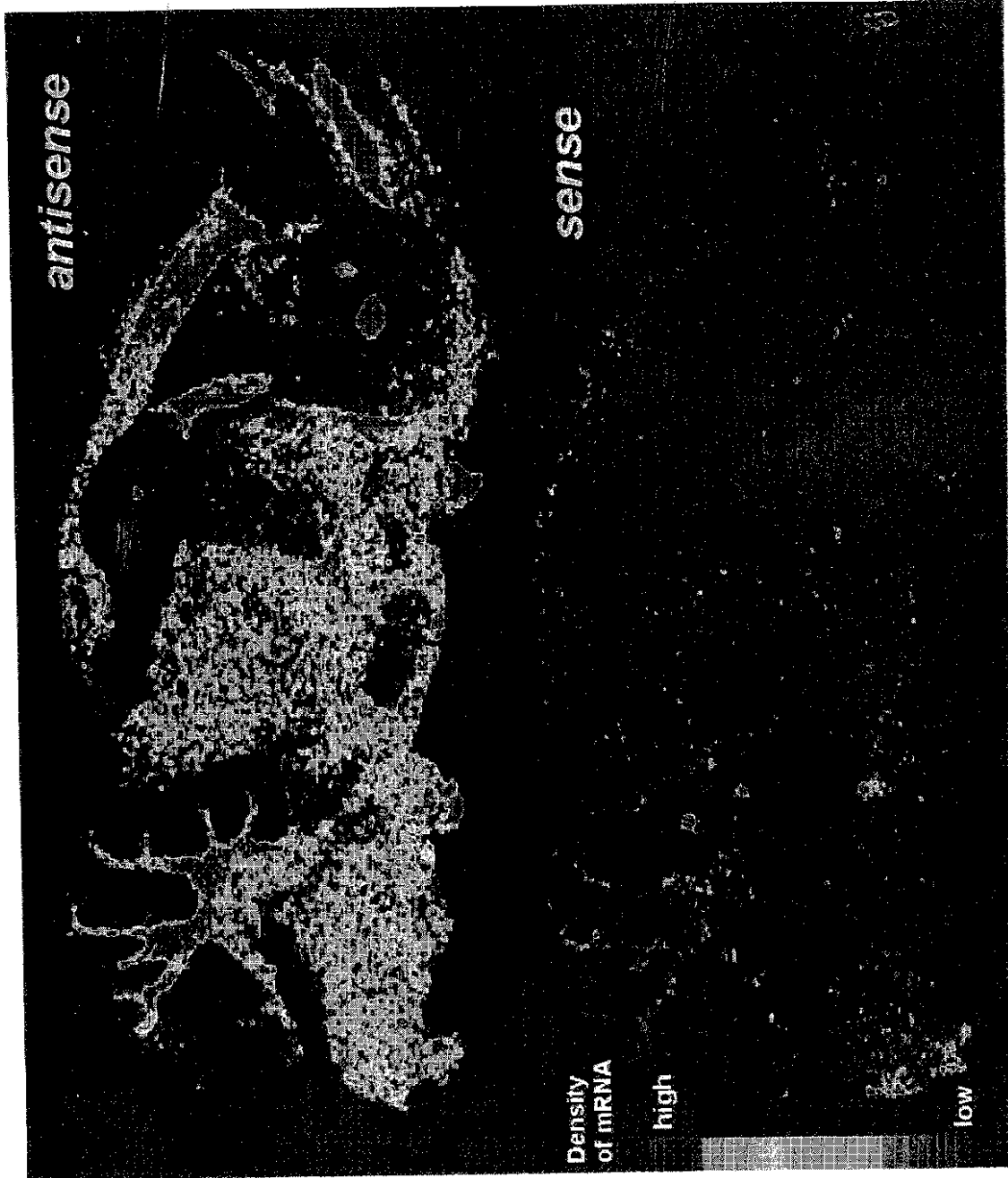


Fig.5

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int'l Application No PCT/EP 00/09475
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
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) WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 78947 A (MERCK PATENT GMBH ; FISCHER VIOLA (DE); DEN DAAS IZAAK (DE); SEYFRI) 28 December 2000 (2000-12-28) SEQ ID No.1 and 2; claims 1-11	1, 4, 6-10
P, X	WO 00 29580 A (INCYTE PHARMA INC ; CORLEY NEIL C (US); GORGONE GINA A (US); GUEGLE) 25 May 2000 (2000-05-25) SEQ ID No.2; claims 1-20	1, 4, 6-9
<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 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 15 February 2001		Date of mailing of the International search report 21/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hornig, H

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Jorat Application No PCT/EP 00/09475
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIYAMOTO H ET AL: "MOLECULAR CLONING OF A NOVEL MRNA SEQUENCE EXPRESSED IN CLEAVAGE STAGE MOUSE EMBRYOS" MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT,US,NEW YORK, NY, vol. 34, no. 1, January 1993 (1993-01), pages 1-7, XP000892775 cited in the application figure 4	1,4,6-9
A	WO 99 00500 A (INCYTE PHARMA INC ;CORLEY NEIL C (US); BANDMAN OLGA (US); SHAH PUR) 7 January 1999 (1999-01-07) the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09475

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0078947 A	28-12-2000	NONE	
WO 0029580 A	25-05-2000	US 6071721 A AU 1724300 A	06-06-2000 05-06-2000
WO 9900500 A	07-01-1999	US 5804419 A AU 8269698 A EP 1002074 A US 5929029 A	08-09-1998 19-01-1999 24-05-2000 27-07-1999

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 C 0 8 4
	1/19		1/21	4 C 0 8 5
	1/21	C 1 2 P	21/02	C 4 H 0 4 5
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 P	21/02		1/68	Z
C 1 2 Q	1/02	G 0 1 N	33/15	Z
	1/68		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	M
	33/50		33/566	
	33/53	A 6 1 K	39/395	N
	33/566		45/00	
// A 6 1 K	39/395	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	45/00		5/00	A
(71)出願人	Frankfurter Str. 250, D - 64293 Darmstadt, Fed eral Republic of Ge rmany			
(72)発明者	デュッカー、 クラウス ドイツ連邦共和国 64291 ダームシュタ ット エテスターシュトラッセ 5			
(72)発明者	デン ダース、 イツァック ドイツ連邦共和国 64407 フレンキッシ ュ-クルムバッハ シュイラーシュトラ ッセ 76			
F タ-ム(参考)	2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 4B024 AA01 BA80 CA04 CA09 CA12 HA17 4B063 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR77 QS25 QS36 QX02 QX07 4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 4B065 AA91Y AB01 CA24 CA44 4C084 AA17 NA14 ZA022 4C085 AA13 AA14 DD62 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA45 DA75 EA21 FA74			

专利名称(译)	头部创伤诱导的细胞质钙结合蛋白的剪接变体		
公开(公告)号	JP2003511026A	公开(公告)日	2003-03-25
申请号	JP2001528576	申请日	2000-09-28
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	デュッカークラウド デンダースイツアック		
发明人	デュッカー、クラウド デンダース、イツアック		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/395 A61K45/00 A61P25/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/62 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P25/00 C07K14/4728 C07K2319/00		
FI分类号	A61P25/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 A61K39/395.N A61K45/00 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/FA74		
优先权	1999119113 1999-10-04 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了ANIC-BP-1B多肽及其多核苷酸，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-1B多肽及其多核苷酸的方法。