

(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 - 527848**

(P2003 - 527848A)

(43)公表日 平成15年9月24日 (2003.9.24)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 2 G 0 4 5
A 6 1 K 39/00		45/00	4 B 0 2 4
45/00		48/00	4 B 0 6 4
48/00		A 6 1 P 9/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 9/00		25/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 55数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 568972(P2001 - 568972)

(86)(22)出願日 平成13年3月20日(2001.3.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月18日(2002.9.18)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/03149

(87)国際公開番号 W001/070771

(87)国際公開日 平成13年9月27日(2001.9.27)

(31)優先権主張番号 00106110.0

(32)優先日 平成12年3月21日(2000.3.21)

(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 GESELLSCHAFT MIT BESCHR  
AENKTER HAFTUNG  
ドイツ連邦共和国 デー - 64293 ダルムシュ  
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、 イザーク  
ドイツ連邦共和国 64407 フランキッシュ  
- クルンバッハ シレルシュトラ  
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】 急性期のニューロン性誘導型カルシウム結合タンパク質タイプ1リガンド

(57)【要約】

ANIC - BP - 1リガンドのポリペプチドおよび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 - 1リガンドの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%の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号2のポリペプチド配列、および

(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、

からなる群から選択されるポリペプチド。

【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下でライブラリをスクリーニングすることにより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、

(g)(a)～(f)のいずれかの前記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、および

(h)(a)～(g)のいずれかのポリヌクレオチドの変異体またはフラグメントであるか、あるいは前記の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

からなる群から選択されるポリヌクレオチド。

【請求項5】 (a)配列番号1のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、

(b)配列番号1のポリヌクレオチド、

(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に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 前記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1～3のいずれか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系。

【請求項7】 請求項1～3のいずれかに記載の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1～3のいずれかに記載のポリペプチドを製造する方法であって、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するステップと、前記ポリペプチドを培養培地から回収するステップとを含む方法。

【請求項9】 免疫グロブリンのFc領域と請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドとからなる融合タンパク質。

【請求項10】 請求項1～3のいずれかに記載の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1～3のいずれかに記載の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1～3のいずれかに記載の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、混合物の活性を候補化合物を含まない対照混合物と比較すること、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産生すること、  
からなる群から選択される方法を含む方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、以下において「ANIC-BP-1リガンド」としばしば呼ばれる、新しく同定されたポリペプチドおよびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、診断においておよび治療上有用となる可能性のあるアゴニスト、アンタゴニストであり得る化合物を同定する際のそれらの使用、ならびにそのようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドの産生とに関する。

**【0002】****(発明の背景)**

創薬プロセスは現在、「機能ゲノム科学」、すなわちハイスループットのゲノム生物学または遺伝子生物学を取り入れ、根本的改革が進められている。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。生体機能または遺伝子の疾患である表現型を同定し、次いで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。

**【0003】**

機能ゲノム科学は、現在入手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に、ハイスループットDNA配列決定技術およびバイオインフォマティクスの様々なツールに大きく依存している。創薬の標的として、さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/タンパク質を同定し、特徴付けることが引き続き求められている。

**【0004】****(発明の概要)**

本発明は、ANIC-BP-1リガンドに関し、詳細にはANIC-BP-1リガンドポリペプチドおよびANIC-BP-1リガンドポリヌクレオチド、組換え体、ならびにそれらの産生法に関する。そのようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、卒中、頭部外傷、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、脊髄損傷（これらに限定されない）を含むある種の疾患（これらは以降

「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物質を用いてアゴニストおよびアンタゴニスト(例えば阻害剤)を同定する方法、ならびに同定された化合物を用いて、ANIC-BP-1リガンドの不均衡に関連した状態を処置する方法に関する。さらにさらなる態様において、本発明はANIC-BP-1リガンドの不適切な活性またはレベルに関連した疾患を検出する診断アッセイに関する。

#### 【0005】

##### (発明の説明)

第一の態様において、本発明はANIC-BP-1リガンド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:

- (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ポリペプチド、
- (c) 配列番号2のポリペプチド配列を含むポリペプチド、
- (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、またはそのようなポリペプチド配列を含むポリペプチド、
- (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。

#### 【0006】

本発明のポリペプチドは、ステライル(sterile)アルファ-モチーフを含有するタンパク質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。したがって、ANIC-BP-1、ANIC-BP-2およびANIC-BP

- 1 Bと呼ばれるANIC - BPファミリーの3つの記載された遺伝子のメンバーが最近同定されたので、それらは注目されている。ANIC - BP - 1は、mRNAディファレンシャルディスプレイの技術を用いて発見されるように、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。

【0007】

ANIC - BP - 1リガンドの生物学的性質は、本発明書以下において、「ANIC - BP - 1リガンドの生物学的活性」または「ANIC - BP - 1リガンド活性」と呼ばれる。好ましくは、本発明のポリペプチドは、ANIC - BP - 1リガンドの生物学的活性の少なくとも1つを示す。

【0008】

本発明のポリペプチドにはまた、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上記ポリペプチドの変異体も含まれる。そのようなポリペプチドは、挿入、欠失、および保存的もしく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50～30個、30～20個、20～10個、10～5個、5～3個、3～2個、2～1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。

【0009】

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、50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、50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ポリペプチドが含まれる。好ましいフラグメントは、ANIC - BPリガンド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。

【0010】

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。

#### 【0011】

本発明のポリペプチドは、任意の好適な方法で、例えば、天然に存在する供給源から、または発現系（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合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。

#### 【0012】

さらなる態様において、本発明はANIC-BP-1リガンド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：

- (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%であるポリヌクレオチド、
- (d) 配列番号1のポリヌクレオチド、
- (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、またはそのようなポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、

(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、またはそのようなポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、ならびに

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。

#### 【0013】

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、30、50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、50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ポリヌクレオチドが含まれる。

#### 【0014】

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つまたは複数の一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドを含む多型体が含まれる。

#### 【0015】

本発明のポリヌクレオチドにはまた、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、50~30個、30~20個、20~10個、10~5個、5~3個、3~2個、2~1個または1個のアミノ酸残基が任意

の組合せで置換、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まれる。

【0016】

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：

- (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。

【0017】

配列番号1のポリヌクレオチド配列は、AB011096 (KIAA0524 ; Nagase T. 他、DNA Research 5、31~39、1998)との相同性を示す。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、GI-3043572 (KIAA0524 ; Nagase T. 他、DNA Research 5、31~39、1998)との相同性および/または構造的類似性を有するステライルアルファモチーフ含有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。

【0018】

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、それらの相通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リガンド活性を有する。

【0019】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒトの骨、脳、乳房、結腸、生殖細胞、心臓、卵巣、膵臓、副甲状腺、胎盤、脾臓、扁桃、子宮および結腸の細胞におけるmRNAに由来するcDNAライブラリ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))。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノムDNAライブラリ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用いて合成することができる。

【0020】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドを組換え製造のために使用する場合、ポリヌクレオチドは、成熟型ポリペプチドだけのコード配列、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ー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、マーカー配列は、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することができる。

【0021】

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(概して少なくとも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)のcDNAクローンおよびゲノムクローン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、一般には、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から25個の間のヌクレオチドを有する。

#### 【0022】

ヒト以外の種に由来するホモログを含む、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、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ентなハイブリダイゼーション条件下でライブラリ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ент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で終夜インキュベーションし、その後、0.1×SSCにおいて約65でフィルター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下でライブラリ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含む。

#### 【0023】

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、本質的に「プロセシング能」（重合反応中に酵素が鋳型に結合したままでいられる能力の尺度）が低い酵素である逆転写酵素が、第一鎖cDNA合成中にmRNA鋳型のDNAコピーを完了できなかった結果である。

#### 【0024】

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末端の迅速な増幅(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)。例えば、Marathon(商標)技術(Clonetech 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(商標)技術では、cDNAが、選ばれた組織から抽出されたmRNAから調製され、そして「アダプター」配列が両端に連結される。その後、核酸増幅(PCR)を行い、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「失われた」5'末端を増幅する。その後、「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、PCR反応を繰り返す。その後、この反応の生成物はDNA配列決定によって分析することができる。生産物を

既存のcDNAに直接連結して完全な配列を得るか、または5'プライマーの設計のための新しい配列情報を用いて別の全長型PCRを行うことにより、全長型cDNAを構築することができる。

#### 【0025】

本発明の組換えポリペプチドは、発現系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)を含む発現系と、そのような発現系で遺伝子操作されている宿主細胞と、および組換え技術による本発明のポリペプチドの製造とに関する。本発明のDNA構築物由来のRNAを用いてそのようなタンパク質を産生するために、無細胞翻訳システムを用いることもできる。

#### 【0026】

組換え製造のために、宿主細胞を遺伝子操作して本発明のポリヌクレオチドに対する発現系またはその一部を取り込ませることができる。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マニュアルに記載され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、スクレイブ負荷、バリスティック導入または感染が含まれる。

#### 【0027】

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菌類細胞；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、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。

【0028】

多様な発現系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、挿入因子に由来するベクター、酵母染色体因子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、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因子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。これらの発現系は、発現を生じさせるためだけでなく、発現を調節するための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系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系に挿入することができる。適当な分泌シグナルを所望のポリペプチドに組み込んで、翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔、細胞周辺腔、または細胞外環境に分泌させることができる。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。

【0029】

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させる場合にはポリペプチドを細胞の表面に産生させることが一般には好ましい。この場合細胞はスクリーニングアッセイで用いる前に回収される。ポリペプチドが培地中に分泌される場合には培地を回収してポリペプチドを回収して精製することができる。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まず細胞を溶解しなければならない。

【0030】

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。

#### 【0031】

本発明のポリヌクレオチドは、関連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り特徴付けられる遺伝子で、機能不全に関連している遺伝子の突然変異型を検出することによって、その遺伝子の発現不足、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、またはそのような診断を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を、この分野で十分に知られている様々な技術によってDNAレベルで検出することができる。

#### 【0032】

診断に必要な核酸は、血液、尿、唾液、組織生検体または解剖体などの被験体の細胞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）または他の増幅法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もまた同様の方法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の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リガンド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、リボヌクレアーゼ消化によって、または融解温度の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）。特定の位置における配列の変化もまた、リボヌクレアーゼ保護または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することができる（Cotton他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、(1985)85:4397~4401）。

#### 【0033】

ANIC-BPリガンド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構築して、例えば、遺伝子変異の効率的なスクリーニングを行うことができる。そのようなアレイは、高密度のアレイまたはグリッドであることが好ましい。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）。

#### 【0034】

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決定するために使用することができる。発現の減少または増加は、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、例えば、核酸増幅（例えばPCR、RT-PCR）など、リボヌクレアーゼ保護、ノーザンブロットングおよび他のハイブリダイゼーション法のいずれかを使用して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、結合タンパク質競合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

## 【0035】

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：

(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もしくは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。

## 【0036】

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。

## 【0037】

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用である。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。本発明に従って関連する配列を染色体に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付け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の「ヒトにおけるメンデル遺伝」において見出される(これはJohns Hopkins大学Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能)。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、その後連鎖解析(物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝)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

る方法、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。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 P.N)。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用いて行われる。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産物の有無を示す93のスコアが得られる。これらのスコアを既知の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する。この比較は<http://www.genome.wi.mit.edu/>において行われる。本発明の遺伝子はヒト染色体の第17染色体(D17S922-D17S798)にマッピングされる。

#### 【0038】

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用なツールである。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を決定することが可能になり、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を、それらをコードするmRNAを検出することによって得ることができる。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(Schena他、Science、270、467~470、1995およびShalon他、Genome Res、6、639~645、1996)などの、グリッド上に配置された様々なクローンに対するインサイチュール(in situ)・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。好ましい方法では、Perki

n Elmer から得られる TAQMAN (商標) 技術が使用される。これらの研究結果により、生物におけるポリペプチドの正常な機能の指標を得ることができる。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、ポリペプチドコード能における変化または調節突然変異を有する形態) によってコードされる mRNA の発現パターンとの比較研究により、本発明のポリペプチドの役割に対する有益な洞察がもたらされ得るか、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がもたらされ得る。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。

#### 【0039】

本発明のポリペプチドは、骨、脳、乳房、結腸、生殖細胞、心臓、卵巣、膵臓、副甲状腺、胎盤、脾臓、扁桃、子宮、結腸において発現している。

#### 【0040】

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い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。

#### 【0041】

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いかなる技術を使用することができる。例としては、ハイブリドーマ技術 (Kohler, G. および Milstein, C., Nature (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 (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。

【0042】

米国特許第4,946,778号に記載される技術などの単鎖抗体の製造技術もまた、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。

【0043】

上記の抗体を用いて、ポリペプチドを発現するクローンを単離もしくは同定する、またはアフィニティクロマトグラフィによりポリペプチドを精製することもできる。本発明のポリペプチドに対する抗体はまた、特に本発明の疾患を治療するために用いることができる。

【0044】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドをワクチンとして使用することもできる。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方法に関する。この方法は、前記動物を疾患から、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保護するために抗体応答および/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)を生じさせるの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ように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インビボ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加速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。配合物は好適なキャリアをさらに含むことができる。ポリペプチドは胃で分解され得るので、非経口で投与される(例えば皮下注射、筋肉内注射、

静脈内注射または皮内注射)ことが好ましい。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物が含まれる。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よって異なるが日常的な実験によって容易に決定することができる。

#### 【0045】

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、前述の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に化合物をスクリーニングする方法を提供する。そのような方法により、本明細書前記のような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、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、ポリペプチドに由来し、すなわち、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))あるいは小分子であり得る。

#### 【0046】

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

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、ポリペプチドを有する細胞に適した検出システムを用いて候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によりシグナルを生じるかどうかを試験することもできる。一般には、活性化阻害剤が既知のアゴニストの存在下でアッセイされ、そして候補化合物の存在下での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生成させるステップと、混合物におけるANIC-BPリガンド活性を測定するステップと、および混合物のANIC-BPリガンド活性を、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。

#### 【0047】

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（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穴マイクロタイター（micotiter）プレートおよびより最近には384穴マイクロタイター（micotiter）プレートのよく確立された使用だけでなく、Schullek他、Anal Biochem.、246、20~29（1997）に記載のナノウエル法などの最近現れた方法もまた含まれる。

#### 【0048】

Fc部分およびANIC-BPリガンドポリペプチドから生成される融合タンパク質などの融合タンパク質もまた、本明細書中前記のように、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に使用することができる（D. Bennett他、J Mol Recognition、8：52~58（1995）；K. Johanson他、J Biol Chem、270（16）：9459~9471（1995））。

#### 【0049】

### 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の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。

#### 【0050】

本発明のポリペプチドを用いて、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、もしあれば膜結合または可溶性受容体を同定することができる。このような技術には、ポリペプチドが放射性同位体（例えば<sup>125</sup>I）で標識されるか、化学修飾（例えばビオチン化）されるか、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リガンド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。

#### 【0051】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体または特定の場合にはオリゴヌクレオチドもしくはタンパク質が含まれ、これらは、リガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連しており、場合により、ポリペプチドに由来し、例えば、リガンド、基質、受容体、酵素などのフラグメントであり、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

性を妨げる小分子が含まれる。

#### 【0052】

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-1リガンド遺伝子の使用を伴うことがある。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-1リガンド遺伝子は、受精卵母細胞の雄性前核へのマイクロインジェクションによって、着床前の胚または着床後の胚へのレトロウイルス移入によって、あるいはエレクトロポレーションなどにより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、いわゆる「ノックイン」動物であり、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。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ことに関して、化合物がヒトの標的に対して特異的である創薬プロセスにおいて有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、いわゆる「ノックアウト」動物であり、本発明のポリペプチドの動物オルソログであり、細胞の内在性DNA配列によってコードされるオルソログの発現が部分的または完全に廃絶されている。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ある種の細胞または組織においてのみ生じ得るか、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、導入遺伝子が発現されて大量の本発明のポリペプチドが得られる、全動物発現-クローニングシステムを提供する。

#### 【0053】

上記の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：

- (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。

## 【0054】

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。

## 【0055】

## (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。

## 【0056】

本明細書中で使用されている「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発現ライブラリまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリの生成物を包含する。

## 【0057】

「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、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または取り出されている、もしく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。

## 【0058】

「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、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り得るか、または一本鎖領域および二本鎖領域の混合であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が含まれるが、これらに限定されることはない。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNAあるいはRNAとDNAとの両方を含む三重鎖領域を意味する。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その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。DNAおよびRNAに対して様々な修飾を行うことができる。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の化学的形態を含む。「ポリヌクレオチド」はまたオリゴヌクレオチドと多くの場合には呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドを含む。

#### 【0059】

「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、ならびに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によって、またはこの分野で十分に知られている化学的な修飾技術によって、そのいずれかで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、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。同じ型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、そして分枝型または非分枝型の環状であり

得る。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調整することができる。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、共有結合的な架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 $\alpha$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカーの形成、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タンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介による付加、ならびユビキチン化が含まれる(例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties、第2版、T.E. Creighton、W.H. Freeman and Company、New York、1993; World, F.、翻訳後のタンパク質修飾:全体像および展望、1~12、Post-translational Covalent Modification of Proteins、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」、Meth Enzymol、182、626~646、1990; Rattan他、「タンパク質合成:翻訳後修飾およびエージング」、Ann NY Acad Sci、663、48~62、1992)。

#### 【0060】

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。

#### 【0061】

「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により、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が変化してもよく、あるいは変化しなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、後述するとおり、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うる。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、あるいはそのような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調製することができる。また、1つ以上の翻訳後修飾（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。本発明の実施形態には、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。

#### 【0062】

「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。

#### 【0063】

「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）の変型をいう。

## 【0064】

「一塩基多型」(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、遺伝子内にもまた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。共通プライマーは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。

## 【0065】

本発明において用いられる「スプライス変異体」は、最初は同じゲノムDNA配列から転写されたが、別のRNAスプライシングを受けたRNA分子から生成したcDNAを意味する。選択的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ているときに生じる。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分子が生じる。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。

## 【0066】

「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する。一般に、同一性とは、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。

## 【0067】

「%同一性」 - 正確な一致が存在しない配列については、「%同一性」が決定

されることがある。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」を一方の配列または両方の配列のいずれかで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することができる（いわゆる全体的アラインメント）：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することができる（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。

#### 【0068】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列の間における関係の、より高度な尺度である。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に入れて、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。

#### 【0069】

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この分野ではよく知られている。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；Genetics 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プログラムを使用して、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では、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）を用いて、2つの配列間における類似性の最も良い領域が見出される。BE

STFIT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。このプログラムでは、短い方の配列が長い方の配列の一部を表すことが仮定されている。比較において、GAPは、Neddleman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」を見出す。GAPは、ほぼ同じ長さの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(Gap Weight)」および「長さ加重(Length Weight)」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ているときに決定される。

#### 【0070】

配列間の同一性および/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(Altschul SF他、J Mol Biol、215、403~410、1990; Altschul SF他、Nucleic Acids Res.、25:389~3402、1997;これはNational Center for Biotechnology Information(NCBI)(Bethesda、Maryland、米国)から入手可能であり、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である)、およびFASTA(Pearson WR、Methods in Enzymology、183、63~99、1990; Pearson WRおよびLipman DJ、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、85、2444~2448、1988;これはウイスコンシン配列分析パッケージの一部として入手可能)。

#### 【0071】

好ましくは、BLOSUM62アミノ酸置換行列(Henikoff Sおよ

びHenikoff JG、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、89、10915～10919、1992)が、比較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。

#### 【0072】

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クエリー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、本明細書中前記のように、クエリー配列および基準配列は最適にアラインメントされ、そしてプログラムのパラメーターは設定省略時の既定値に設定されている。

#### 【0073】

「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)および基準配列を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'末端位置もしくは3'末端位置に、またはこれらの末端位置の間の任意のところに、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、本明細書中前記のように、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。

#### 【0074】

同様にポリペプチドの場合、基準ポリペプ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個までの相違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もしくはカルボキシ末端位置に、またはこれらの末端位置の間の任意のところに、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つ以上の連続した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、本明細書中前記のように、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、置換または挿入もしくはそれらの任意の組合せが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。

#### 【0075】

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：

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

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におけるそれぞれの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  $I$  との積が整数でない場合には最も近い整数に切り捨てられ、その後  $x_a$  からその値を引く。

#### 【0076】

「ホモログ」は、基準配列に対する高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総称である。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。この総称には、「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、別の種におけるその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。

【0077】

「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号に開示されている。Fc-ANIC-BP-1リガンドの場合、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-1リガンドまたはリガンドのフラグメントを機能的に発現させて、治療に使用されたときに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ANIC-BP-1リガンドを生成させるためには好都合である。Fc-ANIC-BP-1リガンドの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のFc領域フラグメントをコードするDNA、およびANIC-BP-1リガンドまたはそのフラグメントをコードするDNAを含む。使用に応じて機能的なFc側を変異させ、その一方で、融合タンパク質の残りの部分を未変化の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)を変化させ得ることまたは発現後にFc部分を完全に除き得ることは望ましい。

【0078】

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。

## 【0079】

(図面の説明)

図1

*S. cerevisiae* EGY48/pSH18-32におけるANIC-BP-1リガンドとANIC-BP-1との相互作用を示す図である。

## 【0080】

*S. cerevisiae* EGY48/18-32(Clontech)を、図に示されるように、LexA活性化ドメイン融合タンパク質およびGal4活性化ドメイン融合タンパク質をコードするプラスミドを使用して形質転換した。図の下側において、単一コロニーを単離して、ヒスチジン、トリプトファンおよびウラシルを含まず、40mg/lのX-Galを含む培地(-WHU-Xgal)またはX-Galを含まない培地(-WHU)に、そしてヒスチジン、トリプトファン、ロイシンおよびウラシルを含まず、40mg/lのX-Galを含有する培地(-WHLU-XGal)に画線培養した。

## 【0081】

すべての菌株が-WHU培地で増殖したことにより、プラスミドの存在が示される。レポーター遺伝子の発現はツーハイブリッドセレクションスキームに依存しているため、ロイシンを含まない培地における酵母の青色コロニーおよび増殖はおとりと獲物との相互作用を示している(レーン5およびレーンC)。レーン1~5およびレーンA~Bがコントロールとして使用される。レーンCは、この酵母ツーハイブリッドシステムにおけるANICとANIC-BP1との相互作用を示している。

## 【0082】

図2

*S. cerevisiae*のEGY48-pSH18-32株を、融合タンパク質をコードするプラスミドで形質転換した図である。-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子の活性を、記載(酵母プロトコルハンドブック、Clontech)の通りにONPGを使用してアッセイした。

## 【0083】

## (実施例)

## プラスミド構築：

pDBLeu-ANIC-BP-1のクローニング：

ANIC-BP-1をコードするcDNAを、プライマーのANICBP-Y2H2-up(配列番号3、プライマー1)およびANICBP-Y2H-low(配列番号4、プライマー2)を使用してPCRにより増幅し、ベクターpCR2.1TOPO(Invitrogen)に連結した。続いて、ベクターを、Nhe1およびNco1を使用して切断して、Mo25をコードするフラグメントをpDBLeuに連結した。

## 【0084】

pLexA-MCS-ANIC-BP-1のクローニング：

オリゴヌクレオチドプライマーのY2H-MCS1(配列番号7、プライマー3)およびY2H-MCS2(配列番号8、プライマー4)をアニーリングして、EcoR1およびSal1により制限されたベクターpLexA(Clontech)に連結して、EcoR1、Sal1、Xho1およびNot1の各制限部位を1つだけ含むベクターpLexA-MCSを作製した。

## 【0085】

ANIC-BP-1をコードするフラグメントを、EcoR1およびSal1を使用してベクターpDBLeu-Mo25から単離し、ベクターpLexA-MCSに連結して、pLexA-MCS-ANIC-BP-1を作製した。すべてのベクターは配列決定により確認された。

## 【0086】

Gal4タンパク質(位置：768~881)およびC末端に連結された全長のANIC-BP-1タンパク質配列を含むGal4-ANIC-BP-1融合タンパク質のペプチド配列が配列番号5に開示されている。LexAタンパク質配列(位置：1~202)およびC末端に連結された全長のANIC-BP-1タンパク質配列を含むLexA-ANIC-BP-1融合タンパク質の対応するペプチド配列が配列番号6に開示されている。

## 【0087】

### ANIC - BP - 1相互作用タンパク質を選択するための酵母ツーハイブリッドスクリーニング

pDBLeu - ANIC - BP - 1をおとり構築物として使用する酵母ツーハイブリッドスクリーニング (Proquest、Life Technologies) を記載の通りに行った (セレクションは、25mMの3 - アミノトリアゾールを含有する - Trp、- Leu、- His 最少培地において行われた)。相互作用は、製造者のプロトコルに記載されるように - ガラクトシダーゼフィルターアッセイと、ウラシル、トリプトファンおよびロイシンを含まない培地とによって確認された。

#### 【0088】

1つの陽性クローンが単離され、配列決定された。対応する相互作用タンパク質リガンドをANIC - BP - 1リガンドと名付けた。配列は配列番号1および配列番号2に開示されている。

#### 【0089】

LexAベース酵母ツーハイブリッド選択スキームを使用するANIC - BP - 1 / ANIC - BP - 1リガンドの相互作用の確認：

異なるセレクションスキームにおける相互作用を確認するために、Matchmaker LexAツーハイブリッドシステム (Clontech) を製造者の条件に従って使用した。ベクターpLexA - MCS - ANICBPをおとりとして使用した。ベクターpPC86 - ANICBPリガンドは、Gal4ベースの酵母ツーハイブリッドシステムにおいて上記に記載されるように単離されたが、これをえものとして使用した。

#### 【0090】

EphrinB2とPICK1との相互作用およびEphrinB2と新規なPDZドメイン含有タンパク質との相互作用を、S. cerevisiaeのEGY48 - pSH18 - 32株における陽性コントロールとして使用した。ロイシンを含まない培地におけるコロニー増殖および青色コロニーの色は、おとりタンパク質とえものタンパク質との相互作用を示している。

#### 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

*S. cerevisiae* EGY48 / pSH18-32におけるANIC-BP-1リガンドとANIC-BP-1との相互作用を示す図である。

## 【図2】

*S. cerevisiae*のEGY48-pSH18-32株を、融合タンパク質をコードするプラスミドで形質転換した図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH

5 <120> ANIC-BP1-ligand

<130> ANIC-BP-1-ligand

<140>

10 <141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 2700

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (363)..(2432)

25 <220>

<223> Description of ANIC-BP-1 protein ligand

<400> 1

30 agccatccct cgccctgctcg ctctctcctt tcgcccactc cctgcatctg ggcctgcac 60

acctttgcc accgctcccc cgatcctgcc gacactcctc ccccaaactt ctgaccggca 120

cccttgctg gtacccttct ctccattcct cccctccat cttctttccc cgaccctct 180

35 cgggtccctc ttttccaaa acccgggtct ctccgctgg ccccgctcc aggcgggga 240

tgcccccg gcgcccgcg ccatggtcct gacgctgctt ctctccgctt acaagctgtg 300

tcgcttcttc gccatgtcgg gccacggcg gggcgccgag cggctggcg tgccctggcc 360

40 ag atg ggg gcg gtg gca cgg gcc cat ggt ggg ctg cgg gtg gcc cgg 407

Met Gly Ala Val Ala Arg Ala His Gly Gly Leu Arg Val Ala Arg

1 5 10 15

45 gcc cgc gaa agt gtc gcc ggg ggc agg cac cga ggt gca gga cgc cct 455

Ala Arg Glu Ser Val Ala Gly Gly Arg His Arg Gly Ala Gly Arg Pro

20 25 30

50 gga gcg cgc gct gcc gga gct gca gca ggc ctt gtc cgc gct gaa gca 503

Gly Ala Arg Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Leu Val Arg Ala Glu Ala

35 40 45

55 ggc ggg cgg cgc gcg ggc cgt ggg cgc cgg cct ggc cga ggt ctt cca 551

Gly Gly Arg Arg Ala Gly Arg Gly Arg Arg Pro Gly Arg Gly Leu Pro

50 55 60

60 act ggt gga gga gcc ctg gct gct gcg gcc gtg ggc cgc gag gta gcc 599

Thr Gly Gly Gly Gly Leu Ala Ala Ala Ala Val Gly Arg Glu Val Ala

65 70 75

60 cag ggt ctg tgc qac gcc atc cgc ctc gat ggc ggc ctc gac ctg ctg 647

	Gln	Gly	Leu	Cys	Asp	Ala	Ile	Arg	Leu	Asp	Gly	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	
	80					85					90					95	
5	ttg	cgg	ctg	ctg	cag	gcg	ccg	gag	ttg	gag	acg	cgt	gtg	cag	gcc	gcg	695
	Leu	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Glu	Leu	Glu	Thr	Arg	Val	Gln	Ala	Ala	
					100					105					110		
10	cgc	ctg	ctg	gag	cag	atc	ctg	gtg	gct	gag	aac	cga	gac	cgc	gtg	gcg	743
	Arg	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Val	Ala	Glu	Asn	Arg	Asp	Arg	Val	Ala	
				115					120					125			
15	cgc	att	ggg	ctg	ggc	gtg	atc	ctg	aac	ctg	gcg	aag	gaa	cgc	gaa	ccc	791
	Arg	Ile	Gly	Leu	Gly	Val	Ile	Leu	Asn	Leu	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Pro	
			130					135					140				
20	gta	gag	ctg	gcg	cgg	agt	ggg	tca	ggc	atc	ttg	gag	cac	atg	ttc	aag	839
	Val	Glu	Leu	Ala	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Leu	Glu	His	Met	Phe	Lys	
			145				150					155					
25	cat	tcg	gag	gag	aca	tgc	cag	agg	ctg	gtg	gcg	gcc	ggc	ggc	ctg	gac	887
	His	Ser	Glu	Glu	Thr	Cys	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Asp	
						165					170					175	
30	gcg	gtg	ctg	tat	tgg	tgc	cgc	cgc	acg	gac	ccc	gcg	ctg	ctg	cgc	cac	935
	Ala	Val	Leu	Tyr	Trp	Cys	Arg	Arg	Thr	Asp	Pro	Ala	Leu	Leu	Arg	His	
					180					185					190		
35	tgc	gcg	ctg	gcg	ctg	ggc	aac	tgc	gcg	ctg	cac	ggg	ggc	cag	gcg	gtg	983
	Cys	Ala	Leu	Ala	Leu	Gly	Asn	Cys	Ala	Leu	His	Gly	Gly	Gln	Ala	Val	
				195				200						205			
40	cag	cga	cgc	atg	gta	gag	aag	cgc	gca	gcc	gag	tgg	ctc	ttc	ccg	ctc	1031
	Gln	Arg	Arg	Met	Val	Glu	Lys	Arg	Ala	Ala	Glu	Trp	Leu	Phe	Pro	Leu	
				210				215					220				
45	gcc	ttc	tcg	aag	gag	gac	gag	ctg	ctt	tcg	ctg	cac	gcc	tgc	ctc	gca	1079
	Ala	Phe	Ser	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Leu	Ala	
			225				230					235					
50	gta	gcg	gtg	ttg	gcg	act	aac	aag	gag	gtg	gag	cgc	gag	gtg	gag	cgc	1127
	Val	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	Arg	Glu	Val	Glu	Arg	
						245					250					255	
55	tcg	ggc	acg	ctg	gcg	ctc	gtg	gag	ccg	ctt	gtg	gcc	tcg	ctg	gac	cct	1175
	Ser	Gly	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Val	Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	
					260					265					270		
60	ggc	cgc	ttc	gcc	cgc	tgt	ctg	gtg	gac	gcc	agc	gac	aca	agc	cag	ggc	1223
	Gly	Arg	Phe	Ala	Arg	Cys	Leu	Val	Asp	Ala	Ser	Asp	Thr	Ser	Gln	Gly	
				275					280					285			
65	cgc	ggg	ccc	gac	gac	ctg	cag	cgc	ctc	gtg	ccg	ttg	ctc	gac	tct	aac	1271
	Arg	Gly	Pro	Asp	Asp	Leu	Gln	Arg	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Asp	Ser	Asn	
				290				295					300				
70	cgc	ttg	gag	gcg	cag	tgc	atc	ggg	gct	ttc	tac	ctc	tgc	gcc	gag	gct	1319
	Arg	Leu	Glu	Ala	Gln	Cys	Ile	Gly	Ala	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ala	Glu	Ala	
				305			310					315					
75	gcc	atc	aag	agc	ctg	caa	ggc	aag	acc	aag	gtg	ttc	agc	gac	atc	ggc	1367
	Ala	Ile	Lys	Ser	Leu	Gln	Gly	Lys	Thr	Lys	Val	Phe	Ser	Asp	Ile	Gly	

	320		325				330				335	
	gcc atc cag agc ctg		aaa cgc ctg gtt tcc tac tct acc aat ggc act									1415
5	Ala Ile Gln Ser	Leu Lys Arg Leu Val Ser Tyr Ser Thr Asn Gly Thr	340	345	350							
	aag tcg gcg ctg gcc aag cgc gcg ctg cgc ctg ctg ggc gag gag gtg											1463
10	Lys Ser Ala Leu Ala Lys Arg Ala Leu Arg Leu Leu Gly Glu Glu Val	355	360	365								
	cca cgg ccc atc ctg ccc tcc gtg ccc agc tgg aag gag gcc gag gtt											1511
15	Pro Arg Pro Ile Leu Pro Ser Val Pro Ser Trp Lys Glu Ala Glu Val	370	375	380								
	cag acg tgg ctg cag cag atc ggt ttc tcc aag tac tgc gag agc ttc											1559
20	Gln Thr Trp Leu Gln Gln Ile Gly Phe Ser Lys Tyr Cys Glu Ser Phe	385	390	395								
	cgg gag cag cag gtg gat ggc gac ctg ctt ctg cgg ctc acg gag gag											1607
25	Arg Glu Gln Gln Val Asp Gly Asp Leu Leu Leu Arg Leu Thr Glu Glu	400	405	410	415							
	gaa ctc cag acc gac ctg ggc atg aaa tcg ggc atc acc cgc aag agg											1655
30	Glu Leu Gln Thr Asp Leu Gly Met Lys Ser Gly Ile Thr Arg Lys Arg	420	425	430								
	ttc ttt agg gag ctc acg gag ctc aag acc ttc gcc aac tat tct acg											1703
35	Phe Phe Arg Glu Leu Thr Glu Leu Lys Thr Phe Ala Asn Tyr Ser Thr	435	440	445								
	tgc gac cgc agc aac ctg gcg gac tgg ctg ggc agc ctg gac ccg cgc											1751
40	Cys Asp Arg Ser Asn Leu Ala Asp Trp Leu Gly Ser Leu Asp Pro Arg	450	455	460								
	ttc cgc cag tac acc tac ggc ctg gtc agc tgc ggc ctg gac cgc tcc											1799
45	Phe Arg Gln Tyr Thr Tyr Gly Leu Val Ser Cys Gly Leu Asp Arg Ser	465	470	475								
	ctg ctg cac cgc gtg tct gag cag cag ctg ctg gaa gac tgc ggc atc											1847
50	Leu Leu His Arg Val Ser Glu Gln Gln Leu Leu Glu Asp Cys Gly Ile	480	485	490	495							
	cac ctg ggc gtg cac cgc gcc cgc atc ctc acg gcg gcc aga gaa atg											1895
55	His Leu Gly Val His Arg Ala Arg Ile Leu Thr Ala Ala Arg Glu Met	500	505	510								
	cta cac tcc ccg ctg ccc tgt act ggt ggc aaa ccc agt ggg gac act											1943
60	Leu His Ser Pro Leu Pro Cys Thr Gly Gly Lys Pro Ser Gly Asp Thr	515	520	525								
	cca gat gtc ttc atc agc tac cgc cgg aac tca ggt tcc cag ctg gcc											1991
65	Pro Asp Val Phe Ile Ser Tyr Arg Arg Asn Ser Gly Ser Gln Leu Ala	530	535	540								
	agt ctc ctg aag gtg cac ctg cag ctg cat ggc ttc agt gtc ttc att											2039
70	Ser Leu Leu Lys Val His Leu Gln Leu His Gly Phe Ser Val Phe Ile	545	550	555								
	gat gtg gag aag ctg gaa gca ggc aag ttc gag gac aaa ctc atc cag											2087
75	Asp Val Glu Lys Leu Glu Ala Gly Lys Phe Glu Asp Lys Leu Ile Gln	560	565	570	575							

```

    agt gtc atg ggt gcc cgc aac ttt gtg ttg gtg cta tca cct gga gca 2135
    Ser Val Met Gly Ala Arg Asn Phe Val Leu Val Leu Ser Pro Gly Ala
                580                      585                      590
5
    ctg gac aag tgc atg caa gac cat gac tgc aag gat tgg gtg cat aag 2183
    Leu Asp Lys Cys Met Gln Asp His Asp Cys Lys Asp Trp Val His Lys
                595                      600                      605
10
    gag att gtg act gct tta agc tgc ggc aag aac att gtg ccc atc att 2231
    Glu Ile Val Thr Ala Leu Ser Cys Gly Lys Asn Ile Val Pro Ile Ile
                610                      615                      620
15
    gat ggc ttc gag tgg cct gag ccc cag gtc ctg cct gag gac atg cag 2279
    Asp Gly Phe Glu Trp Pro Glu Pro Gln Val Leu Pro Glu Asp Met Gln
                625                      630                      635
20
    gct gtg ctt act ttc aac ggt atc aag tgg tcc cac gaa tac cag gag 2327
    Ala Val Leu Thr Phe Asn Gly Ile Lys Trp Ser His Glu Tyr Gln Glu
    640                      645                      650                      655
25
    gcc acc att gag aag atc atc cgc ttc ctg cag ggc cgc tcc tcc cgg 2375
    Ala Thr Ile Glu Lys Ile Ile Arg Phe Leu Gln Gly Arg Ser Ser Arg
                660                      665                      670
30
    gac tca tot gca ggc tot gac acc agt ttg gag ggt gct gca ccc atg 2423
    Asp Ser Ser Ala Gly Ser Asp Thr Ser Leu Glu Gly Ala Ala Pro Met
                675                      680                      685
35
    ggt cca acc taaccagtcc ccagttcccc agccctgctg tgacttccat 2472
    Gly Pro Thr
    690
35
    ttccatcgtc ctttctgaag gaacagctcc tgaaccagc ctcctctgggc tgagacaacc 2532
35
    tgggctcttc ttaggaaatg gctctccctc ccctctgccc ccaccctcat ggcccacctc 2592
40
    caaccactt tcctcagtat ctggagaggg aagggaagtc aggcttgggc acgggaggtt 2652
40
    agaactcccc caggccctgc cattgggttg tctgtctccg tcatgggg 2700

<210> 2
<211> 690
45 <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <223> Description of ANIC-BP-1 protein ligand

<400> 2
50 Met Gly Ala Val Ala Arg Ala His Gly Gly Leu Arg Val Ala Arg Ala
    1 5 10 15
    Arg Glu Ser Val Ala Gly Gly Arg His Arg Gly Ala Gly Arg Pro Gly
    20 25 30
55 Ala Arg Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Leu Val Arg Ala Glu Ala Gly
    35 40 45
60 Gly Arg Arg Ala Gly Arg Gly Arg Arg Pro Gly Arg Gly Leu Pro Thr
    50 55 60

```

	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Gln
	65					70					75					80
5	Gly	Leu	Cys	Asp	Ala	Ile	Arg	Leu	Asp	Gly	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	Leu
					85					90					95	
	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Glu	Leu	Glu	Thr	Arg	Val	Gln	Ala	Ala	Arg
				100					105					110		
10	Leu	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Val	Ala	Glu	Asn	Arg	Asp	Arg	Val	Ala	Arg
			115					120				125				
	Ile	Gly	Leu	Gly	Val	Ile	Leu	Asn	Leu	Ala	Lys	Glu	Arg	Glu	Pro	Val
15		130					135					140				
	Glu	Leu	Ala	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Ile	Leu	Glu	His	Met	Phe	Lys	His
	145					150					155					160
20	Ser	Glu	Glu	Thr	Cys	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala
					165					170					175	
	Val	Leu	Tyr	Trp	Cys	Arg	Arg	Thr	Asp	Pro	Ala	Leu	Leu	Arg	His	Cys
				180					185						190	
25	Ala	Leu	Ala	Leu	Gly	Asn	Cys	Ala	Leu	His	Gly	Gly	Gln	Ala	Val	Gln
			195					200					205			
	Arg	Arg	Met	Val	Glu	Lys	Arg	Ala	Ala	Glu	Trp	Leu	Phe	Pro	Leu	Ala
30		210					215					220				
	Phe	Ser	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Leu	Ala	Val
	225					230					235					240
35	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Asn	Lys	Glu	Val	Glu	Arg	Glu	Val	Glu	Arg	Ser
					245					250					255	
	Gly	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Val	Ala	Ser	Leu	Asp	Pro	Gly
				260					265					270		
40	Arg	Phe	Ala	Arg	Cys	Leu	Val	Asp	Ala	Ser	Asp	Thr	Ser	Gln	Gly	Arg
			275					280						285		
	Gly	Pro	Asp	Asp	Leu	Gln	Arg	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Asp	Ser	Asn	Arg
45		290					295						300			
	Leu	Glu	Ala	Gln	Cys	Ile	Gly	Ala	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ala	Glu	Ala	Ala
	305					310					315					320
50	Ile	Lys	Ser	Leu	Gln	Gly	Lys	Thr	Lys	Val	Phe	Ser	Asp	Ile	Gly	Ala
					325					330					335	
	Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Arg	Leu	Val	Ser	Tyr	Ser	Thr	Asn	Gly	Thr	Lys
				340					345					350		
55	Ser	Ala	Leu	Ala	Lys	Arg	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Gly	Glu	Glu	Val	Pro
			355					360					365			
	Arg	Pro	Ile	Leu	Pro	Ser	Val	Pro	Ser	Trp	Lys	Glu	Ala	Glu	Val	Gln
60		370					375					380				
	Thr	Trp	Leu	Gln	Gln	Ile	Gly	Phe	Ser	Lys	Tyr	Cys	Glu	Ser	Phe	Arg



<210> 3  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 5  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer 1  
 <400> 3  
 10 cgatgctagc atgccgttcc cgtttggg 28

<210> 4  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 15  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: primer 2  
 20  
 <400> 4  
 cgatccatgg ttaagcttct tgctgagc 28

<210> 5  
 <211> 496  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 30  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Gal4-ANIC-BP-1  
 fusion protein  
 <400> 5  
 35 Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu  
     1                    5                    10                    15  
 Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu  
                     20                    25                    30  
 40 Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro  
                     35                    40                    45  
 Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu  
 45                    50                    55                    60  
 Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile  
     65                    70                    75                    80  
 50 Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu  
                     85                    90                    95  
 Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala  
                     100                    105                    110  
 55 Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser  
                     115                    120                    125  
 60 Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu  
     130                    135                    140

	Thr	Val	Ser	Ser	Arg	Ser	Thr	Pro	Gly	Ala	Ser	Met	Pro	Phe	Pro	Phe
	145					150					155					160
5	Gly	Lys	Ser	His	Lys	Ser	Pro	Ala	Asp	Ile	Val	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu
					165					170						175
	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Glu	Lys	Gln	Asp	Ile	Ser	Asp	Lys	Lys	Ala	Glu
				180					185					190		
10	Lys	Ala	Thr	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Asn	Leu	Val	Ala	Met	Lys	Glu	Ile
			195					200					205			
	Leu	Tyr	Gly	Thr	Asn	Glu	Lys	Glu	Pro	Gln	Thr	Glu	Ala	Val	Ala	Gln
15		210					215					220				
	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Tyr	Asn	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Val	Ala
	225					230					235					240
20	Asp	Leu	Gln	Leu	Ile	Asp	Phe	Glu	Gly	Lys	Lys	Asp	Val	Ala	Gln	Ile
					245					250						255
	Phe	Asn	Asn	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Ile	Gly	Thr	Arg	Thr	Pro	Thr	Val
				260					265					270		
25	Glu	Tyr	Ile	Cys	Thr	Gln	Gln	Asn	Ile	Leu	Phe	Met	Leu	Leu	Lys	Gly
			275					280					285			
	Tyr	Glu	Ser	Pro	Glu	Ile	Ala	Leu	Asn	Cys	Gly	Ile	Met	Leu	Arg	Glu
30		290					295					300				
	Cys	Ile	Arg	His	Glu	Pro	Leu	Ala	Lys	Ile	Ile	Leu	Trp	Ser	Glu	Gln
	305					310					315					320
35	Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Arg	Tyr	Val	Glu	Met	Ser	Thr	Phe	Asp	Ile	Ala
					325					330					335	
	Ser	Asp	Ala	Phe	Ala	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Leu	Thr	Arg	His	Lys	Leu
			340						345					350		
40	Leu	Ser	Ala	Glu	Phe	Leu	Glu	Gln	His	Tyr	Asp	Arg	Phe	Phe	Ser	Glu
			355					360					365			
	Tyr	Glu	Lys	Leu	Leu	His	Ser	Glu	Asn	Tyr	Val	Thr	Lys	Arg	Gln	Ser
45		370					375					380				
	Leu	Lys	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Arg	His	Asn	Phe	Thr	Ile
	385					390					395					400
50	Met	Thr	Lys	Tyr	Ile	Ser	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Lys	Leu	Met	Met	Asn
					405					410						415
	Leu	Leu	Arg	Asp	Lys	Ser	Arg	Asn	Ile	Gln	Phe	Glu	Ala	Phe	His	Val
				420					425					430		
55	Phe	Lys	Val	Phe	Val	Ala	Asn	Pro	Asn	Lys	Thr	Gln	Pro	Ile	Leu	Asp
			435				440						445			
	Ile	Leu	Leu	Lys	Asn	Gln	Ala	Lys	Leu	Ile	Glu	Phe	Leu	Ser	Lys	Phe
60		450					455					460				
	Gln	Asn	Asp	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	Gln	Phe	Asn	Asp	Glu	Lys	Thr	Tyr



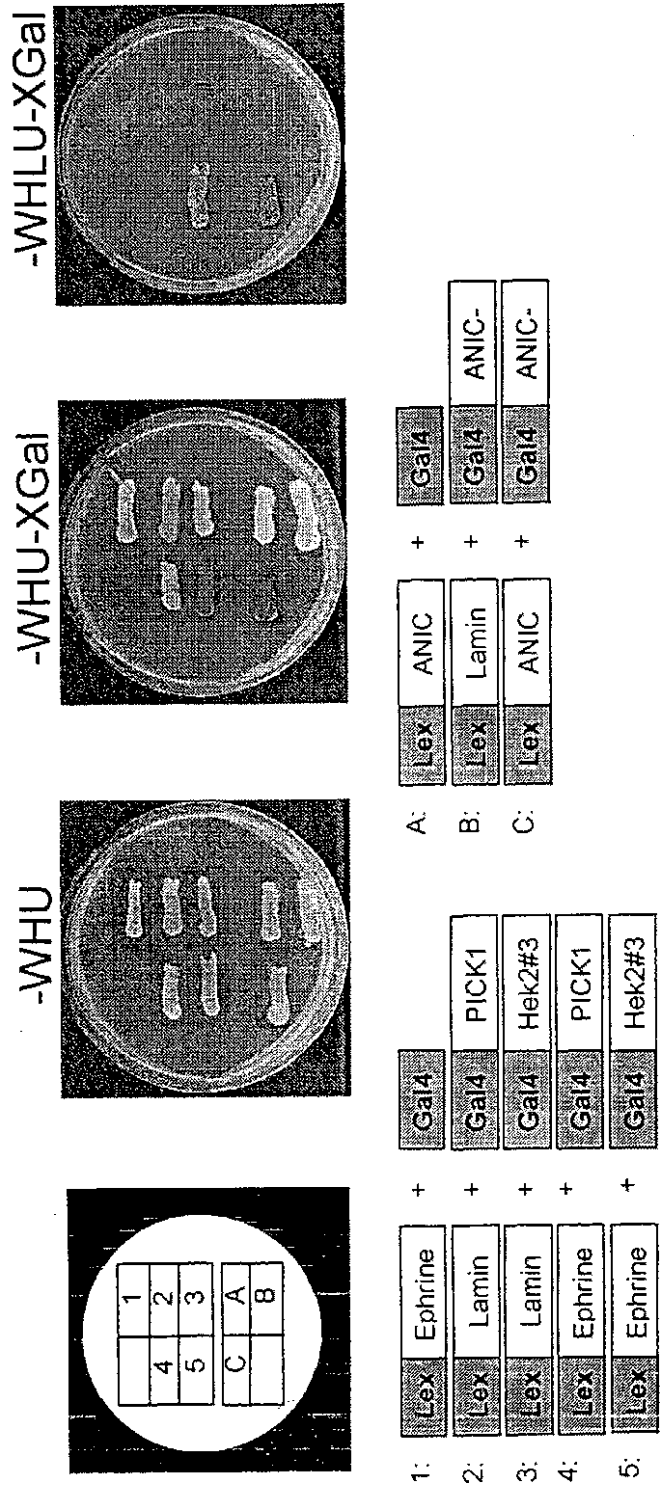
Asp Ile Val Lys Asn Leu Lys Glu Ser Met Ala Val Leu Glu Lys Gln  
 225 230 235 240  
 5 Asp Ile Ser Asp Lys Lys Ala Glu Lys Ala Thr Glu Glu Val Ser Lys  
 245 250 255  
 Asn Leu Val Ala Met Lys Glu Ile Leu Tyr Gly Thr Asn Glu Lys Glu  
 260 265 270  
 10 Pro Gln Thr Glu Ala Val Ala Gln Leu Ala Gln Glu Leu Tyr Asn Ser  
 275 280 285  
 Gly Leu Leu Ser Thr Leu Val Ala Asp Leu Gln Leu Ile Asp Phe Glu  
 290 295 300  
 15 Gly Lys Lys Asp Val Ala Gln Ile Phe Asn Asn Ile Leu Arg Arg Gln  
 305 310 315 320  
 20 Ile Gly Thr Arg Thr Pro Thr Val Glu Tyr Ile Cys Thr Gln Gln Asn  
 325 330 335  
 Ile Leu Phe Met Leu Leu Lys Gly Tyr Glu Ser Pro Glu Ile Ala Leu  
 340 345 350  
 25 Asn Cys Gly Ile Met Leu Arg Glu Cys Ile Arg His Glu Pro Leu Ala  
 355 360 365  
 Lys Ile Ile Leu Trp Ser Glu Gln Phe Tyr Asp Phe Phe Arg Tyr Val  
 370 375 380  
 30 Glu Met Ser Thr Phe Asp Ile Ala Ser Asp Ala Phe Ala Thr Phe Lys  
 385 390 395 400  
 35 Asp Leu Leu Thr Arg His Lys Leu Leu Ser Ala Glu Phe Leu Glu Gln  
 405 410 415  
 His Tyr Asp Arg Phe Phe Ser Glu Tyr Glu Lys Leu Leu His Ser Glu  
 420 425 430  
 40 Asn Tyr Val Thr Lys Arg Gln Ser Leu Lys Leu Leu Gly Glu Leu Leu  
 435 440 445  
 Leu Asp Arg His Asn Phe Thr Ile Met Thr Lys Tyr Ile Ser Lys Pro  
 450 455 460  
 45 Glu Asn Leu Lys Leu Met Met Asn Leu Leu Arg Asp Lys Ser Arg Asn  
 465 470 475 480  
 50 Ile Gln Phe Glu Ala Phe His Val Phe Lys Val Phe Val Ala Asn Pro  
 485 490 495  
 Asn Lys Thr Gln Pro Ile Leu Asp Ile Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys  
 500 505 510  
 55 Leu Ile Glu Phe Leu Ser Lys Phe Gln Asn Asp Arg Thr Glu Asp Glu  
 515 520 525  
 Gln Phe Asn Asp Glu Lys Thr Tyr Leu Val Lys Gln Ile Arg Asp Leu  
 530 535 540  
 60 Lys Arg Pro Ala Gln Gln Glu Ala

545 550

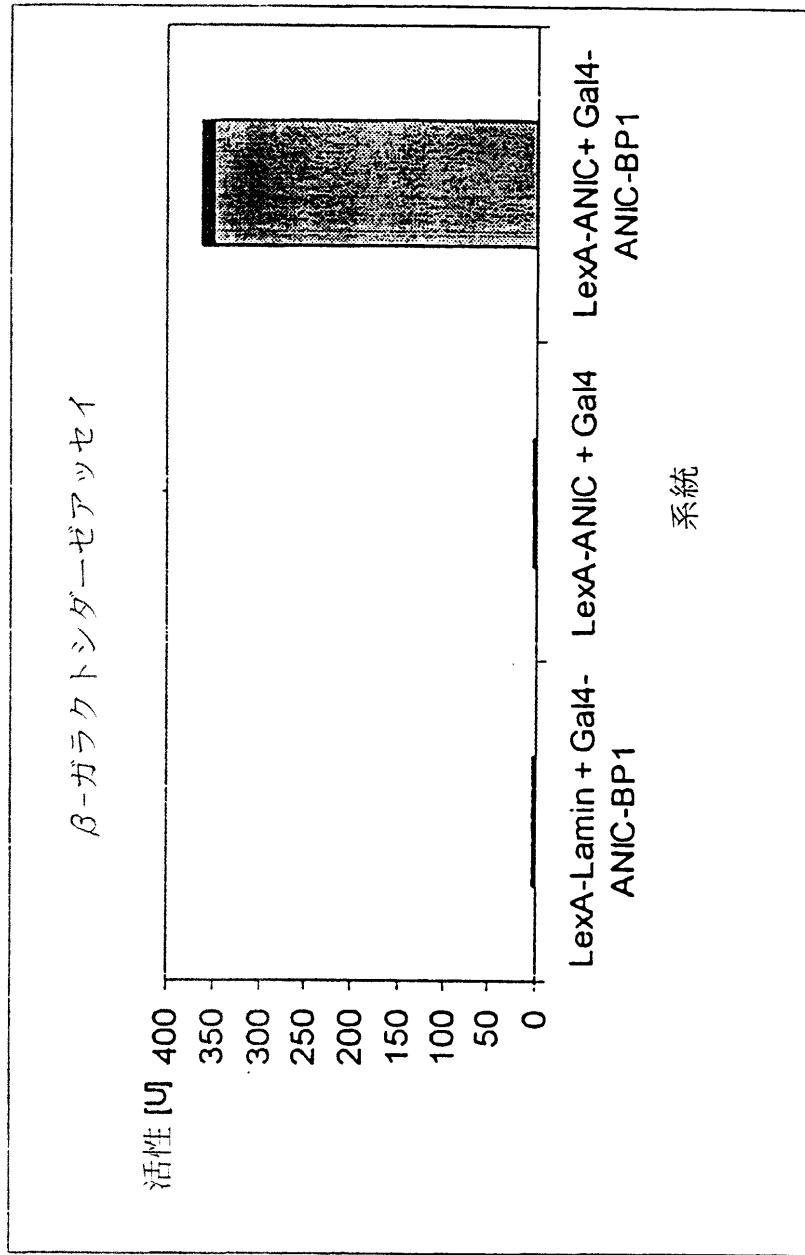
<210> 7  
5 <211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
10 <223> Description of Artificial Sequence: primer 3  
  
<400> 7  
aattccaggt cgacctcgag gcggccgct 29  
  
15  
<210> 8  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
20  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: primer 4  
  
<400> 8  
25 tcgaaccggc cgacctcgagg tcgacctgg 29

【 1 】

Figure 1 from 2



【図2】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/EP 01/03149
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/62 C12Q1/68 C12N5/10 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 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBL, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 10 April 1998 (1998-04-10) NAGASE, T. ET AL.: "KIAA0524 PROTEIN (FRAGMENT)." retrieved from EBI Database accession no. AB011096 XP000884356 cited in the application abstract	1-11
X	-& DATABASE TREMBL 'Online! 1 August 1998 (1998-08-01) retrieved from EBI Database accession no. 060277 XP002187866 cited in the application abstract	1-11
--- /---		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<sup>a</sup> Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 21 January 2002		Date of mailing of the international search report 08/02/2002
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 Gurdjian, D

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/03149

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
I	<p>MINK MATYAS ET AL: "A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, Drosophila, and Caenorhabditis elegans." GENOMICS, vol. 74, no. 2, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 234-244, XP002187847 ISSN: 0888-7543 abstract; figure 5 -----</p>	1-8

2

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	25/00	A 6 1 P	25/16	4 C 0 8 5
	25/16		25/28	4 H 0 4 5
	25/28		37/00	
	37/00		43/00	1 1 1
	43/00	1 1 1	C 0 7 K	14/47
C 0 7 K	14/47			16/18
	16/18			19/00
	19/00	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/15		1/19	
	1/19		1/21	
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
G 0 1 N	33/15		33/53	D
	33/50			M
	33/53		33/566	
		C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/566		5/00	A
(71)出願人	Frankfurter Str. 250, D - 64293 Darmstadt, Fed eral Republic of Ge rmany			
(72)発明者	デン ダース、 イザーク ドイツ連邦共和国 64407 フランキッシ ュ - クルンバッハ シレルシュトラ-セ 76			
(72)発明者	デュッカー、 クラウス ドイツ連邦共和国 64291 ダルムシュタ ット エッテスターシュトラ-セ 5			
(72)発明者	ホック、 ブイエーン ドイツ連邦共和国 63477 マイントル ノルドシュトラ-セ 2 ア-			
F タ-ム(参考)	2G045 AA34 AA35 BB20 DA13 DA36 FB01 FB02 FB03 4B024 AA01 AA11 BA44 CA01 CA07 GA11 4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13 4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46 4C084 AA13 AA16 NA14 ZA022 ZA032 ZA162 ZA362 ZC422 4C085 AA03 BB11 GG02 GG03 GG04 GG05 4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40 EA20 EA50 FA74			

专利名称(译)	急性神经元诱导的钙结合蛋白1型配体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003527848A</a>	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2001568972	申请日	2001-03-20
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	デンダースイザーク デュッカークラウド ホックブイエーン		
发明人	デンダース、イザーク デュッカー、クラウド ホック、ブイエーン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/62 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P9/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K2319/00		
FI分类号	A61K39/00.H A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P37/00 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/CA07 4B024/GA11 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA032 4C084/ZA162 4C084/ZA362 4C084/ZC422 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2000106110 2000-03-21 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了ANIC-BP-1配体多肽和多核苷酸以及重组产生这种多肽的方法。  
还公开了在诊断测定中使用ANIC-BP-1配体多肽和多核苷酸的方法。

