

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-532035

(P2005-532035A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 9
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-556445 (P2003-556445)
 (86) (22) 出願日 平成14年12月20日 (2002.12.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年8月18日 (2004.8.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/005856
 (87) 国際公開番号 W02003/055915
 (87) 国際公開日 平成15年7月10日 (2003.7.10)
 (31) 優先権主張番号 0130721.4
 (32) 優先日 平成13年12月21日 (2001.12.21)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 502334043
 インファーマティカ リミテッド
 イギリス ロンドン ダブリュー1ティー
 2 エヌユー チャーロット ストリート
 60
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084009
 弁理士 小川 信夫
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治
 (74) 代理人 100114007
 弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜貫通型タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、INSP017タンパク質が膜貫通型タンパク質分子、好ましくはネトリン受容体ファミリーの膜貫通型タンパク質分子として機能するという発見に基づく。

1 LPESLPSAPG TI-PHFIEEFD DAYLIEKSNPI ALRCKARFAM QIFPKNGEM
 51 VHQNEHVSFR ELDESEGLKY SEVFNVTRQ QVEDFPCPRD YMCQCVARSH
 101 LGTSKSRKAS VRIAYTRKNF EQDDQREVP EGGELVLIQR ESEGVPAAEV
 151 EWLKNEPID SEQDENITFR ADHBJLRQA RLSDSNYTC KAANIVAKRR
 201 SFSN'VVVVV NGGWSSWLEW SACHVRCGRG WQKRERTCN EAPLNGGATC
 251 SONSQKRTTC TSTCPVDGSW EVNSSEWAVCS PECEHRTIRE CLAPDQNGG
 301 KEECEIQES EMTDGLICLL GIENASDLAT YSSTGANNVA VAVLVIGYTL
 351 YRRSQSYXSV DYTDSBALTC GEOTINERTV RQNSLJLNS ANQPIVAVSR
 401 TYSGPICLQD PLDKELMTES SIFKPLSDEK VKVQSEFMYS LGVSERAEZH
 451 GKNHRIEFDH GNNKSESTMH EANKQFYIQN LSAVPERTEL RTTGVEGHEG
 501 GKLVHFNTEV SLLIPHGAIK EDNGWEIYMS INQGEPSLQS DGSEVLDSFE
 551 VTCGPPDMIV TTPKALTIPI CADVSESHWN IHLKRTQGS KWEVMSVED
 601 ESTSCYCLLD PFRCEVLLDS EGTATVGEF ITDCAVRQLK VAVTQKESCN
 651 SLDYNRVYC VENTPCAPQE VVSDERHQGG Q'LEEVKLLH FRGNTFSLDI
 701 SVLDPPPLW RIKPFAQKE VPFNRVWCSN EQPLKCRFSL ERYTPTTQL
 751 SCXTCIRQLK GIBQ'LVQVT SILESEFRET ITPAQENSTF PAQTCPKPK
 801 LPYSVQRQC ATPDTPNAGK KDWQMLAQK SINRNLSYFA TQSSPSAVIL
 851 KMEARHIOHD COLDQACAL ERTGRLEAL SNESESQ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (i) から (iii) のいずれかのポリペプチド：

(i) 配列番号：34又は配列番号：32に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド（好ましくは、配列番号：34に記載のアミノ酸配列からなる）；

(ii) 膜貫通型タンパク質機能、特にネトリン受容体活性、または (i) のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する (i) のポリペプチドのフラグメントである；または

(iii) (i) もしくは (ii) の機能的等価物である。

【請求項 2】

膜貫通型タンパク質分子、さらにネトリン受容体ファミリーの膜貫通型タンパク質分子として機能する請求項 1 に記載のポリペプチド。 10

【請求項 3】

配列番号：32又は配列番号34に記載のアミノ酸配列からなる請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 (iii) の機能的等価物であり、配列番号：34に記載のアミノ酸配列と相同であるポリペプチド。

【請求項 5】

配列番号：34に記載のアミノ酸配列と98%、98.5%、99%又は99.5%を超える配列同一性を有する請求項 1～4のいずれか1項記載の機能的等価物。 20

【請求項 6】

配列番号：34に記載のアミノ酸配列と98.5%を超える配列同一性を有する請求項 1～5のいずれか1項記載の機能的等価物。

【請求項 7】

請求項 1 (i) のポリペプチドと共通の抗原決定基を有し、配列番号：32又は配列番号：34の配列に由来する7つまたはそれより多い（例えば8、10、12、14、16、18、20またはそれより多い）アミノ酸残基から成る請求項 1 記載のフラグメント。

【請求項 8】

請求項 1～6のいずれか1項記載のポリペプチドをコードする精製核酸分子。

【請求項 9】

配列番号：31又は配列番号：33に記載の核酸配列を有するか、または余剰部分を含むその等価物もしくはそのフラグメントである請求項 2 に記載の精製核酸分子。 30

【請求項 10】

高いストリンジェンシーの条件下で請求項 8 または 9 記載の核酸分子とハイブリダイズする精製核酸分子。

【請求項 11】

請求項 8 から 10 のいずれか 1 項記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 12】

請求項 11 に記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 13】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと特異的に結合し、好ましくはその活性を刺激するリガンド。 40

【請求項 14】

抗体である請求項 13 記載のリガンド。

【請求項 15】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項記載のポリペプチドの発現レベルもしくは活性レベルを増加または低下させる化合物。

【請求項 16】

前記ポリペプチドの生物学的作用のいずれをも誘発することなく、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項記載のポリペプチドと結合する請求項 15 記載の化合物。 50

【請求項 17】

前記が天然もしくは改変基質、リガンド、酵素、レセプターまたは構造的もしくは機能的模倣物である請求項16記載の化合物。

【請求項 18】

疾患の治療または診断に使用するための、請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子、請求項11記載のベクター、請求項12記載の宿主細胞、請求項13または14記載のリガンド、または請求項15から17のいずれか1項記載の化合物。

【請求項 19】

患者に由来する組織で、請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを判定するか、または請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチドの活性を判定し、さらに前記発現レベルまたは活性レベルをコントロールレベルと比較することを含み、前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する、患者の疾患を診断する方法。

10

【請求項 20】

*in vitro*で実施される請求項19記載の方法。

【請求項 21】

(a) 請求項13または14記載のリガンドを生物学的サンプルと、リガンド-ポリペプチド複合体の形成に適した条件下で接触させる工程；および (b) 前記複合体を検出する工程を含む、請求項19または20記載の方法。

20

【請求項 22】

(a) 患者由来の組織サンプルを核酸プローブと、請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子と前記プローブとの間でハイブリッド複合体の形成を許容するストリンジエントな条件下で接触させる工程；

(b) コントロールサンプルを前記プローブと工程(a)で用いた条件と同じ条件下で接触させる工程；さらに、

(c) 前記サンプルにおけるハイブリッド複合体の存在を検出する工程を含み、コントロールサンプルのハイブリッド複合体のレベルと異なる患者サンプルのハイブリッド複合体レベルの検出が疾患を示唆する、請求項19または20記載の方法。

30

【請求項 23】

(a) 患者の組織由来の核酸サンプルを核酸プライマーと、請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子と前記プライマーとの間でハイブリッド複合体の形成を許容するストリンジエントな条件下で接触させる工程；

(b) コントロールサンプルを前記プライマーと工程(a)で用いた条件と同じ条件下で接触させる工程；

(c) 前記サンプルの核酸を増幅させる工程；および、

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

コントロールサンプルの増幅核酸レベルと顕著に異なる患者サンプルの増幅核酸レベルの検出は疾患を示唆する、請求項19または20記載の方法。

40

【請求項 24】

以下の(a) - (c)の工程を含む請求項19または20に記載の方法：

(a) 疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

(b) 前記組織サンプルから請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子を単離する工程；および、

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

【請求項 25】

さらに核酸分子を増幅させて増幅生成物を形成し、前記増幅生成物で変異の有無を検出することを含む請求項24に記載の方法。

50

【請求項26】

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

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

によって、前記患者における変異の有無を検出する請求項24または25記載の方法。

【請求項27】

前記疾患が、細胞増殖性疾患、特に脳腫瘍、神経系腫瘍、新生物、骨腫瘍及び骨髄増殖性疾患、特に顆粒球性白血病、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、神経障害、例えばうつ病、精神分裂症、脳損傷、脊髄損傷、神経損傷、発達障害、例えば神経系発達の傷害、神経系炎症、例えば運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症及び炎症性神経障害、骨疾患、アテローム性硬化症、糸球体腎炎、悪疫質、エイズ、HIV感染、代謝異常、例えば糖尿病、感染症、生殖異常、不妊症、胎児着床不全、妊娠障害及び分娩合併症並びに他の病理学的状態、特にネトリン受容体が関係するものから選択される請求項19から26のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項28】

膜貫通型タンパク質として、好ましくはネトリン受容体としての請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチドの使用。

20

【請求項29】

請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子、請求項11記載のベクター、請求項12記載の宿主細胞、請求項13または14記載のリガンド、または請求項15から17のいずれか1項記載の化合物を含む医薬組成物。

【請求項30】

請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチドまたは請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子を含むワクチン組成物。

【請求項31】

以下の疾患の治療用医薬の製造で使用される、請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子、請求項11記載のベクター、請求項12記載の宿主細胞、請求項13または14に記載のリガンド、請求項15から17のいずれか1項記載の化合物、または請求項29に記載の医薬組成物：細胞増殖性疾患、特に脳腫瘍、神経系腫瘍、新生物、骨腫瘍及び骨髄増殖性疾患、特に顆粒球性白血病、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、神経障害、例えばうつ病、精神分裂症、脳損傷、脊髄損傷、神経損傷、発達障害、例えば神経系発達の傷害、神経系炎症、例えば運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症及び炎症性神経障害、骨疾患、アテローム性硬化症、糸球体腎炎、悪疫質、エイズ、HIV感染、代謝異常、例えば糖尿病、感染症、生殖異常、不妊症、胎児着床不全、妊娠障害及び分娩合併症並びに他の病理学的状態、特にネトリン受容体が関係するもの。

30

40

【請求項32】

請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチド、請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子、請求項11記載のベクター、請求項12記載の宿主細胞、請求項13または14記載のリガンド、または請求項15から17のいずれか1項記載の化合物または請求項29に記載の医薬組成物を患者に投与することを含む、患者の疾患を治療する方法。

【請求項33】

天然の遺伝子の発現またはポリペプチドの活性が健常な対象者での発現または活性レベルと比較したとき疾患を有する患者で低い疾患に対して、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物または組成物がアゴニストである請求項32に記載の方法。

50

【請求項34】

天然の遺伝子の発現またはポリペプチドの活性が健常な対象者での発現または活性レベルと比較したとき疾患を有する患者で高い疾患に対して、前記患者に投与されるポリペプチド、核酸分子、ベクター、リガンド、化合物または組成物がアンタゴニストである請求項32に記載の方法。

【請求項35】

請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチドの発現レベルもしくは活性レベル、または請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子の発現レベルを前記患者由来の組織においてある期間モニターすることを含む、患者で疾患の治療をモニターする方法であって、コントロールのレベルに対して前記期間の間の発現レベルまたは活性レベルの変化が前記疾患の退縮の指標である前記疾患の治療をモニターする方法。

10

【請求項36】

請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチドまたは請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子を、前記ポリペプチドまたは核酸分子に対し結合親和性を有すると思われる1つまたは2つ以上の化合物と接触させ、さらに前記核酸分子またはポリペプチドと特異的に結合する化合物を選別することを含む、疾患の治療および/または診断で有効な化合物の同定方法。

【請求項37】

請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器；前記核酸分子の増幅に有用なプライマーを含む第二の容器；および疾患の診断を促進するために前記プローブおよびプライマーを使用するための指示を含む疾患の診断に有用なキット。

20

【請求項38】

さらにハイブリダイズしないRNAを消化するための物質を収納する第三の容器を含む請求項37のキット。

【請求項39】

核酸分子のアレイを含むキットであって、前記核酸分子の少なくとも1つが請求項8から10のいずれか1項記載の核酸分子である、前記キット。

【請求項40】

請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチドと結合する1つまたは2つ以上の抗体、および前記抗体と前記ポリペプチドとの間の結合反応を検出するために有用な試薬を含むキット。

30

【請求項41】

請求項1から7のいずれか1項記載のポリペプチドをより高いレベルで又はより低いレベルで発現する、または発現しない、形質転換された非ヒトトランスジェニック動物またはノックアウト動物。

【請求項42】

請求項41記載の非ヒトトランスジェニック動物を候補化合物と接触させ、さらに前記動物の疾患に対する前記化合物の作用を決定することによって、疾患の治療に有効な化合物をスクリーニングする方法。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、本明細書において膜貫通型タンパク質として（特にネトリン（netrin）受容体ファミリーのメンバーとして）、同定された新規タンパク質（INSP017）に関し、さらに疾患の診断、予防および治療におけるこのタンパク質およびそのコード遺伝子に由来する核酸配列の使用に関する。

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

【0002】

50

(背景)

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

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

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

【0003】

(ネトリン受容体ファミリーの背景)

移動性ニューロン軸索は、しばしば多重選択ポイントでそのターゲットを見つけるために誘導分子の正しい提示を必要とする。ネトリンは、誘引及び忌避軸索の両方に関与し、従って誘導分子として機能して中枢神経系における細胞移動及び軸索パス発見 (path-finding) プロセスを可能にする分泌タンパク質のファミリーである (Where the rubber meets the road: netrin expression and function in developing and adult nervous systems. Manitt C, Kennedy TE. Prog Brain Res 2002;137:425-42; Cook, G et al Curr. Opin. Neurobiol (1998) 8, 64-72)。

UNC-5タンパク質ファミリーのメンバーは、ネトリン誘導信号用膜貫通型受容体であり (Hong K, et al. Cell 1999 Jun 25;97(7):927-41)、ネトリン-1のための依存受容体 (拡散性誘引物質 / 忌避物質) として作用することによって哺乳類の神経系の発育に重要な役割を果たすと考えられる。INSP17は、UNC-5ファミリーのメンバーであると考えられる。ネトリン-1受容体DCCは、軸索の誘導のネトリン源への方向づけに結び付けられており、UNC-5ファミリーのメンバーはネトリン源からの移動に必要である (Hong K, et al. (1999); Finger JH, et al. 2002 Dec 1;22(23):10346-56)。

実験的証拠により、UNC-5ファミリーのメンバーであるUnc5h3は、Unc5h3の変異によって同型接合であるマウスが失調症でありかつ小脳発育不全及び層状構造欠陥を有する発育中のマウスの小脳における細胞移動の際に重要な役割を果たすことが示された (Ackerman, S and Knowles, B. Genomics (1998) Sep 1;52(2):205-8)。UNC5H3の変異によって同型接合であるマウスは、失調症であり、小脳発育不全及び層状構造欠陥を有する。マウスUNC5H3遺伝子のヒト型相同体は染色体4q21-q23に局在し、パーキンソン病遺伝子と密接に結び付いている (Ackerman, S and Knowles, B. Genomics (1998) Sep 1;52(2):205-8)。UNC-5ファミリーのメンバーは、細胞質が位置付けられる死滅領域を含むI型受容体である。ネトリン-1の非存在下で、細胞発現UNC-5受容体がアポトーシスを起こし、ネトリン-1の存在下で、アポトーシスをブロックする。従って、これらの受容体は発現される細胞中のリガンドの存在に依存性を与える。最近の研究により、UNC-5受容体がカスパーゼによってタンパク質分解切断を起こしうるが示され、粉の切断がアポトーシスに必要であることが示された (Llambi, F et al. EMBO J (2001) 20, 2715-2722)。

このように、この種の膜貫通型タンパク質は、多様な生理学的機能において役割を果たすことが示されており、その多くは疾患プロセスにおける役割を果たしうる。その活性の変化は、疾患の表現型を変える手段であり、従って新規の膜貫通型タンパク質の同定は、それが多くの疾患、特に炎症性疾患、腫瘍学、及び循環器病において役割を果たす場合があることと非常に関連している。従って、新規の膜貫通型タンパク質の同定は、疾患を治療するための新規薬剤の開発において役割を果たす可能性がある。

【0004】

10

20

30

40

50

(本発明)

本発明は、INSP017タンパク質が膜貫通型タンパク質分子として、さらにネトリン受容体ファミリーの膜貫通型タンパク質分子として機能するという発見を基にしている。

第一の特徴では、本発明はポリペプチドを提供し、前記ポリペプチドは、

(i) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32および/または配列番号：34に記載のアミノ酸配列を含む(からなる(必要により))；

(ii) それらのフラグメントであって、膜貫通型タンパク質、特にネトリン受容体として活性を有するか、または(i)のポリペプチドと共通の抗原決定基を有する、前記フラグメントである；または

(iii) (i)または(ii)の機能的同等物である。

好ましくは、この態様のポリペプチドは配列番号：32又は配列番号：34に記載のアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記ポリペプチドは配列番号：32又は配列番号：34に記載のアミノ酸配列から成る。

配列番号：2に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン1ポリペプチド”と称される。配列番号：4に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン2ポリペプチド”と称される。配列番号：6に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン3ポリペプチド”と称される。配列番号：8に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン4ポリペプチド”と称される。配列番号：10に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン5ポリペプチド”と称される。配列番号：12に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン6ポリペプチド”と称される。配列番号：14に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン7ポリペプチド”と称される。配列番号：16に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン8ポリペプチド”と称される。配列番号：18に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン9ポリペプチド”と称される。配列番号：20に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン10ポリペプチド”と称される。配列番号：22に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン11ポリペプチド”と称される。配列番号：24に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン12ポリペプチド”と称される。配列番号：26に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン13ポリペプチド”と称される。配列番号：28に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン14ポリペプチド”と称される。配列番号：30に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017エクソン15ポリペプチド”と称される。配列番号：32及び配列番号：34に記載の配列を有するポリペプチドは以下では“INSP017ポリペプチド”と称される。配列番号：32のポリペプチドは、配列番号：34に記載の配列を有するポリペプチドの部分配列である。用語“INSP017ポリペプチド”は、また以下のポリペプチドの1つ以上をひとまとめにして参照するために本明細書で使用される：配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32および配列番号：34。

【0005】

“膜貫通型タンパク質としての活性を有する”とは、膜貫通型タンパク質のファミリー内の保存特徴であると同定されうるアミノ酸配列又は構造的特徴を含むポリペプチドを参照する。

“ネトリン受容体としての活性を有する”とは、ネトリン受容体のファミリー内の保存特徴であると同定されうるアミノ酸配列又は構造的特徴を含むポリペプチドを参照するので、このポリペプチドの活性は全長野生型ポリペプチドの機能と比較して実質的に悪影響を与えない。Unc5-様ネトリン受容体ファミリーの同様の他のメンバーであるINSP017は、以下の領域を含む：a) . (pfam00791)、ZU5領域。未知の機能のZ0-1及びUnc5-様ネト

10

20

30

40

50

リン受容体領域にある領域； b) . (pfam00531)、細胞質の死滅領域； c) . (pfam00090)、トロンボスポンジン I 型領域； d) . (pfam00047)、免疫グロブリン領域。好適には、用語“ネトリン受容体としての活性を有する”は4つの前述の領域の1つ、2つ、3つ又は4つを有するポリペプチドを参照する。用語“ネトリン受容体としての活性を有する”が領域 a) 及び / 又は b) を有するポリペプチドを参照することは特に好ましい。

好ましくは、本発明のポリペプチド又は核酸配列は、ABK88064若しくはKIAA1777 (図参照) のアミノ酸及び核酸配列又はJP2002153290-A若しくはWO 02/33080に記載されるアミノ酸又は核酸配列ではない。

【 0 0 0 6 】

第二の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする精製核酸分子を提供する。好ましくは、前記精製核酸分子は、配列番号：1 (INSP017エクソン1ポリペプチドをコードする)、配列番号：3 (INSP017エクソン2ポリペプチドをコードする)、配列番号：5 (INSP017エクソン3ポリペプチドをコードする)、配列番号：7 (INSP017エクソン4ポリペプチドをコードする)、配列番号：9 (INSP017エクソン5ポリペプチドをコードする)、配列番号：11 (INSP017エクソン6ポリペプチドをコードする)、配列番号：13 (INSP017エクソン7ポリペプチドをコードする)、配列番号：15 (INSP017エクソン8ポリペプチドをコードする)、配列番号：17 (INSP017エクソン9ポリペプチドをコードする)、配列番号：19 (INSP017エクソン10ポリペプチドをコードする)、配列番号：21 (INSP017エクソン11ポリペプチドをコードする)、配列番号：23 (INSP017エクソン12ポリペプチドをコードする)、配列番号：25 (INSP017エクソン13ポリペプチドをコードする)、配列番号：27 (INSP017エクソン14ポリペプチドをコードする)、配列番号：29 (INSP017エクソン15ポリペプチドをコードする)、配列番号：31 (INSP017ポリペプチドをコードする)、配列番号：33 (全長 INSP017ポリペプチドをコードする) に記載の核酸配列を有するか、またはこれら配列のいずれかの重複性 (redundant) 等価物またはフラグメントである。

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

第四の特徴では、本発明は、本発明の第二または第三の特徴の核酸分子を含むベクター、例えば発現ベクターを提供する。本発明のこの特徴の好ましい態様では、ベクターは、PCR4-TOP0-INSP017ベクターである (図 6 参照) 。

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

第六の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドと特異的に結合し、さらに好ましくは前記ポリペプチドの活性を刺激するリガンドを提供する。

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

本発明の第七の特徴の化合物は、前記ポリペプチドの遺伝子の発現レベルまたは活性レベルを増加させるか (アゴニスト作用)、または低下させる (アンタゴニスト作用)。重要なことには、INSP017ポリペプチドの機能を同定することによって、疾患の治療および / または診断に有効な化合物を同定することができるスクリーニング方法のデザインが可能になる。

【 0 0 0 7 】

第八の特徴では、本発明は、診断または治療で使用するために本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を提供する。これらの分子はまた、細胞増殖性疾患、特に脳腫瘍、神経系腫瘍、新生物、骨腫瘍及び骨髄増殖性疾患、特に顆粒球性白血病、自己免疫 / 炎症性疾患、心脈管系疾患、神経疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、神経障害、例えばうつ病、精神分裂症、脳損傷、脊髄損傷、神経損傷、発達障害、例えば神経系発達

10

20

30

40

50

の傷害、神経系炎症、例えば運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症及び炎症性神経障害、骨疾患、アテローム性硬化症、糸球体腎炎、悪疫質、エイズ、HIV感染、代謝異常、例えば糖尿病、感染症、生殖異常、不妊症、胎児着床不全 (embryo implantation failure)、妊娠障害及び分娩合併症並びに他の病理学的状態、特にネトリン受容体が関係するものを治療する医薬の製造においても用いることができる。

【0008】

第九番目の特徴では、本発明は患者で疾患を診断する以下の工程を含む方法を提供する：本発明の第一の特徴のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベル、または本発明の第一の特徴のポリペプチドの活性レベルを前記患者由来の組織で評価し、さらに前記発現または活性レベルをコントロールレベルと比較する工程であって、この場合前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する。前記の方法は好ましくは *in vitro* で実施されるであろう。同様な方法は患者での疾患治療のモニタリングに使用することができる。この場合、時間の経過にしたがってポリペプチドまたは核酸分子の発現もしくは活性レベルがコントロールレベルに向かって変化するのは疾患の緩解の指標となる。

10

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

本発明の第九番目の特徴に記載の方法には、例えば短いプローブによる核酸ハイブリダイゼーション法、点変異分析、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅、および異常なタンパク質レベルを検出する抗体を用いる方法といった種々の異なる方法が存在することは、当業者には明らかであろう。同様な方法を短期または長期ベースで用いて、モニターされる疾患の治療を可能にすることができる。本発明はまた前記疾患診断方法で有用なキットも提供する。

20

【0009】

第十番目の特徴では、本発明は、膜貫通型タンパク質、好ましくはネトリン受容体としての本発明の第一の特徴のポリペプチドの使用を提供する。本発明の第一の特徴のポリペプチドは、神経保護剤 (neuroprotectant) としての有用性も見出すことができる。

第十一番目の特徴では、本発明は医薬組成物を提供し、前記医薬組成物は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を医薬的に許容できる担体と組合わせて含有する。

30

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

【0010】

第十三番目の特徴では、本発明は患者の疾患を治療する方法を提供し、前記方法は、本発明の第一の特徴のポリペプチド、または本発明の第二もしくは第三の特徴の核酸分子、または本発明の第四の特徴のベクター、または本発明の第六の特徴のリガンド、または本発明の第七の特徴の化合物を患者に投与することを含む。

40

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

第十四番目の特徴では、本発明は、本発明の第一の特徴のポリペプチドを高レベルで、

50

または低レベルで発現させるために、または全く発現させないために形質転換したトランスジェニックまたは遺伝子ノックアウト非ヒト動物を提供する。前記トランスジェニック動物は、疾患の研究用モデルとして非常に有用であり、さらに前記疾患の治療または診断に有効な化合物の同定を目的とするスクリーニング方法で用いることができる。

【0011】

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

10

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

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

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

20

【0012】

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

30

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

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

40

【0013】

ポリペプチドは、天然のプロセス（例えば翻訳後プロセッシング）によって、または当業者に周知の化学的改変技術によって改変された、20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでいてもよい。本発明のポリペプチドに一般的に存在する公知の改変にはグリ

50

コシル化、脂質付加、硫化、 α -カルボキシル化（例えばグルタミン酸残基の）、ヒドロキシル化およびADP-リボシル化がある。他の可能な改変には、アセチル化、アシル化、アミド化、フラビンの共有結合付加、ヘム部分の共有結合付加、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付加、脂質誘導体の共有結合付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合付加、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、GPIアンカー形成、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク分解性プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、タンパク質へのトランスファーRNA媒介性アミノ酸付加（例えばアルギニル化）およびユビキチン結合が含まれる。

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

10

【0014】

ポリペプチド内に生じる改変は多くの場合ポリペプチドが生成される方法によって変動するであろう。組換えによって生成されるポリペプチドの場合、大部分の改変の性質および程度は、個々の宿主細胞の改変能力および問題のポリペプチドのアミノ酸配列に存在する改変シグナルによって決定されるであろう。例えば、グリコシル化パターンは異なる種類の宿主細胞間で変動するであろう。

20

本発明のポリペプチドは任意の適切な様式で調製することができる。そのようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド（例えば細胞培養から精製）、組換えにより生成されたポリペプチド（融合タンパク質を含む）、合成により生成されたポリペプチド、または前記方法を併用して生成されたポリペプチドが含まれる。

本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP017ポリペプチド（好ましくはINSP034）と相同なポリペプチドであろう。本明細書で用いる用語として、2つのポリペプチドは、前記ポリペプチドの一方の配列が他方のポリペプチドの配列に対して充分な同一性または類似性を有する場合、“相同である”と称する。“同一性”とは、アラインメントを施した配列のどの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で同一であることを示す。“類似性”は、アラインメントを施した配列のいずれの特定の場所においても、アミノ酸残基が前記配列間で類似の種類であることを示す。同一性および類似性の度合いは容易に計算できる（Computational Molecular Biology, A.M. Lesk ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, D.W. Smith ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, G. von Heinje, Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, M. Gribskov and J. Devereux eds., M. Stockton Press, New York, 1991）。

30

【0015】

したがって、相同なポリペプチドには、INSP017ポリペプチド（好ましくは配列番号：34に記載されるアミノ酸配列）の天然の生物学的変種（例えば前記ポリペプチドが由来した種における対立形質変種または地理的変種）および変異体（例えばアミノ酸置換、挿入または欠失を含む変異体）が含まれる。前記変異体は、1つまたは2つ以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸残基（好ましくは保存的アミノ酸残基）で置換されているポリペプチドを含んでもよく、さらにそのような置換アミノ酸残基は遺伝コードでコードされたものでもそうでなくてもよい。典型的な前記の置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間で；SerとThr間で；酸性残基AspとGlu間で；AsnとGln間で、塩基性残基LysとArg間で；または芳香族残基PheとTyr間で生じる。特に好ましいものは、いくつ（すなわち5から10、1から5、1から3、1から2、または単に1つ）のアミノ酸が任意の組合せで置換されたまたは欠失または付加された変種である。特に好ましいものは、タンパク質の特性および活

40

50

性を変化させないサイレント置換、付加および欠失である。さらにこれに関して特に好ましいものは保存的置換である。

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

【0016】

典型的には、2つのポリペプチド間で80%を越える同一性は機能的等価物の指標であると考えられる。好ましくは、本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドは、INSP017ポリペプチド（好ましくは配列番号：34）と、またはその活性なフラグメントと80%を越える配列同一性を有する。より好ましいポリペプチドは、それぞれ90%、95%、98%、98.5%、99%または99.5%を越える同一性を有する。

本発明の第一の特徴の機能的に等価なポリペプチドはまた、構造についてのアラインメントの1つまたは2つ以上の技術を用いて同定されたポリペプチドであろう。例えば、バイオペンジウム（Biopendium）検索データベースの作製に用いられる検索ツールの一角を構成するインファーマティカ=ゲノムスレッダー（Inpharmatica Genome Threader）技術を用いて（同時係属PCT特許出願（PCT/GB01/01105（WO 01/69507として公開される））を参照されたい）、現在のところ機能は未知であるが、INSP017ポリペプチド配列との顕著な構造的相同性を共有するために、分泌分子活性を有すると予測される（一方、INSP017ポリペプチドと比較して低い配列同一性しかもたないが）ポリペプチドを同定することができる。“顕著な構造的相同性”とは、インファーマティカ=ゲノムスレッダーが2つのタンパク質が10%以上の確度で構造的相同性を共有すると予測することを意味する。

本発明の第一の特徴のポリペプチドはまた、INSP017ポリペプチド（好ましくは、配列番号：34）のフラグメント並びにINSP017ポリペプチド（好ましくは、配列番号：34）の機能的等価物のフラグメントを含むが、ただしこれらフラグメントがネトリン受容体活性を保持するか、またはINSP017ポリペプチドと共通の抗原決定基を有することを条件とする。

【0017】

本明細書において用いる、“フラグメント”という用語は、INSP017ポリペプチド（好ましくは、配列番号：34）またはその機能的等価物の1つのアミノ酸配列の部分（全体ではないが）と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。前記フラグメントは、前記配列に由来する少なくともn個の連続したアミノ酸を含むべきであり、さらに個々の配列に応じてnは好ましくは7またはそれより大きい（例えば8、10、12、14、16、18、20またはそれより大きい）。小さなフラグメントは抗原決定基を構成することができる。

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

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

【0018】

10

20

30

40

50

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

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

【0019】

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

本発明の第一の特徴のポリペプチドに対して生成されたモノクローナル抗体のパネル(panel)を種々の特性、すなわちアイソタイプ、エピトープ、親和性などについてスクリーニングすることができる。モノクローナル抗体は、それらを作らせた個々のポリペプチドの精製に特に有用である。あるいは、対象のモノクローナル抗体をコードする遺伝子を、例えば当技術分野で知られるPCR技術によってハイブリドーマから単離し、さらにクローニングし適切なベクターで発現させることができる。

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

【0020】

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

また別の選択肢では、前記抗体は、2つの異なる抗原結合ドメインを有し、各ドメインは異なるエピトープに誘導される“二重特異性”抗体であってもよい。

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

上記の技術によって作製された抗体は（ポリクローナルであれモノクローナルであれ）、免疫アッセイ、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）で試薬として用いることができるというさらに別の有用性を有する。前記の利用では、

10

20

30

40

50

これら抗体は分析的に検出可能な試薬（例えば放射性同位元素、蛍光分子または酵素）で標識することができる。

【0021】

本発明の第二および第三の特徴の好ましい核酸分子は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32および配列番号：34に記載のポリペプチド配列並びに機能的に等価なポリペプチドをコードするものである。これら核酸分子を本明細書に記載した方法および用例で用いることができる。本発明の核酸分子は、好ましくは本明細書に開示した配列に由来する少なくともn個の連続するヌクレオチドを含み、この場合、前記個々の配列に応じてnは10またはそれより大きい（例えば12、14、15、18、20、25、30、35、40またはそれより大きい）。

10

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

本発明の核酸分子は、RNA（例えばmRNA）、またはDNA（例えばcDNA、合成DNAまたはゲノムDNAを含む）の形態をとることができる。そのような核酸分子は、クローニングによって、化学合成によって、またはそれらを併用して得ることができる。前記核酸分子は、固相ホスホルアミダイト化学合成のような技術を用いるゲノムまたはcDNAライブラリーからの化学合成によって、または生物体から分離することによって調製することができる。RNA分子は一般的にはDNA配列のin vitroまたはin vivo転写によって作製することができる。

20

核酸分子は二本鎖でも一本鎖でもよい。一本鎖DNAはコード鎖（センス鎖としても知られる）でも、非コード鎖（アンチセンス鎖とも称される）でもよい。

“核酸分子”という用語には、DNAおよびRNAのアナログ（例えば改変骨格を含むもの）、並びにペプチド核酸（PNA）も含まれる。本明細書で用いられる“PNA”という用語はアンチセンス分子または抗遺伝子(anti-gene)作用因子を指し、長さが少なくとも5ヌクレオチドであってアミノ酸残基のペプチド骨格と結合したオリゴヌクレオチドを含む。前記ペプチド骨格は好ましくはリジンで終わり、前記末端リジンは当該組成物に可溶性を付与する。PNAはPEG化(pegylated)されて細胞内での寿命が延長されてもよい{細胞内では、PNAは優先的に相補性一本鎖DNAおよびRNAと結合して転写物の伸長を停止させる(P.E. Nielsen et al. (1993) Anticancer Drug Des. 8: 53 - 63)}。

30

【0022】

配列番号：2のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：1に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：4のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：3に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：6のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：5に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：8のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：7に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：10のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：9に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：12のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：11に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：14のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：13に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：16のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：15に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：18のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：17に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：20のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：19に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：22のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：21に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：24のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：23に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：26のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：25に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：28のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：27に示

40

50

した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：30のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：29に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：32のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：31に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。配列番号：34のポリペプチドをコードする核酸分子は、配列番号：33に示した核酸分子のコード配列と同一であろう。これらの分子はまた、遺伝コードの縮退の結果として、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32および配列番号：34のポリペプチドをコードする配列と異なる配列を有することもできる。そのような核酸分子には、それだけで成熟なポリペプチドのためのコード配列；成熟ポリペプチドのためのコード配列および付加コード配列（例えばリーダー配列または分泌配列をコードするもの）、例えばプロ-、プレ-またはプレプロ-ポリペプチド配列をコードするもの；前述の付加的コード配列を伴う、または伴わないが、さらに付加的な非コード配列（非コード5'および3'配列を含む）を伴う成熟ポリペプチドのコード配列が含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記の非コード5'および3'配列は、例えば転写される非翻訳配列で、転写（終止シグナルを含む）、リボソーム結合およびmRNA安定性において役割を果たすものである。前記核酸分子は、更なる官能性を提供するアミノ酸のような付加アミノ酸をコードする付加配列を含むこともできる。

10

【0023】

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

20

このような変種の中では、特にヌクレオチドの置換、欠失または挿入によって前述の核酸分子と異なる変種が挙げられる。置換、欠失または挿入は1つまたは2つ以上のヌクレオチドを含むことができる。変種はコード領域または非コード領域またはその両方が変化していてもよい。コード領域における変化は、保存的または非保存的なアミノ酸置換、欠失または挿入をもたらす得る。

30

本発明の核酸分子はまた、多様な理由で、遺伝子生成物（ポリペプチド）のクローニング、プロセッシングおよび/または発現の改変を含む当該技術分野で一般的に知られている方法を用いて操作され得る。ランダムフラグメント化によるDNAシャッフリングおよび遺伝子フラグメントおよび合成オリゴヌクレオチドのPCRリアッセムブリーは、ヌクレオチド配列の操作に用いられ得る技術に含まれる。位置特異的突然変異誘発を用いて、新規な制限部位の挿入、グリコシル化パターンの変更、コドンの優先性の変化、スプライシング変種の生成、変異の導入など、その他を行うことができる。

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

40

本発明の核酸分子にはまた本発明のポリペプチドをコードする核酸分子と部分的に相補的であり、したがってコード核酸分子とハイブリダイズする（ハイブリダイゼーション）アンチセンス分子が含まれる。そのようなアンチセンス分子（例えばオリゴヌクレオチド）は、当業者にはよく知られるように、本発明のポリペプチドをコードする標的核酸を認識し、その標的核酸と特異的に結合してその転写を妨げるようにデザインすることができ

50

る（例えば以下の文献を参照されたい：J.S. Cohen, Trends in Pharm. Sci., 10: 435(1989)； J. Okano, Neurochem. 56: 560(1991)； J. O' Connor, Neurochem. 56: 560(1991)； Lee et al., Nucleic Acids Res. 6: 3073(1979)； Cooney et al., Science 241: 456(1988)； Dervan et al., Science 251: 1360(1991)）。

【0024】

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

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

“ストリンジェンシー”とは、異なる分子の結合よりも非常に類似した分子の結合に適したハイブリダイゼーション反応の条件を指す。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、以下を含む溶液（50%のホルムアミド、5倍のSSC（150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5倍のデンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、および20 μg/mLの変性せん断サケ精子DNA）中で42 °Cで一晩インキュベーションし、続いてフィルターを0.1倍のSSCで約65 °Cで洗浄すると定義される。低ストリンジェンシー条件は、ハイブリダイゼーション反応が35 °Cで実施されることを含む（Sambrook et al.（上掲書）を参照されたい）。好ましくは、ハイブリダイゼーションに用いられる条件は高ストリンジェンシーを構成するものである。

【0025】

本発明のこの特徴の好ましい態様は、INSP017ポリペプチド（配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、配列番号：30、配列番号：32及び配列番号：34）をコードする核酸分子およびそのような核酸分子と実質的に相補的な核酸分子とその全長にわたって少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、又は98%同一である核酸分子である。好ましくは、本発明のこの特徴の核酸分子は、配列番号：1、配列番号：3で与えられる配列を有する核酸分子またはそれらと相補的な核酸分子とその全長にわたって少なくとも80%同一の領域を含む。これに関しては、前記とその全長にわたって少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも98%または99%同一の核酸分子が好ましい。この特徴の好ましい態様は、INSP017ポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を保持するポリペプチドをコードする核酸分子である。

【0026】

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

本発明にしたがって利用することができるアッセイに関連して下記でさらに考察するように、上記で述べた核酸分子をRNA、cDNAまたはゲノムDNAのためのハイブリダイゼーションプローブとして用い、INSP017ポリペプチドをコードする完全長のcDNAおよびゲノムクローンを単離し、さらに前記ポリペプチドをコードする遺伝子と高い配列類似性を有する

10

20

30

40

50

相同遺伝子またはオーソログ遺伝子のcDNAまたはゲノムクローンを単離することができる。

これに関しては、当技術分野で公知の他の技術の中で特に以下の技術を利用することができる。これらの技術は例示として下記で考察される。DNAのシーケンシングおよび解析のための方法は周知で、当技術分野では一般的に利用可能であり、本明細書で考察される本発明の態様の多くを実施するために実際に用いることができる。そのような方法では、DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント、シークエナーゼ（US Biochemical Corp., Cleveland, OH）、Taqポリメラーゼ（Perkin Elmer）、耐熱性T7ポリメラーゼ（Amersham, Chicago, IL）、またはポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼの組合せ（例えば市販（Gibco/BRL, Gaithersburg, MD）のELONGASE増幅キットで見出されるようなもの）のよ

10

20

30

40

50

【0027】

INSP017ポリペプチドの機能と等価な機能を有するポリペプチドをコードする核酸分子を単離する方法の1つは、当技術分野で知られている標準的な方法を用いる、天然のプロープまたは人工的にデザインしたプロープによるゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーの探索である（例えば以下の文献を参照されたい：“Current Protocols in Molecular Biology”, Ausubel et al.(eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992）。特に有用なプロープは、適切なコード遺伝子（配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15、配列番号：17、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：29、配列番号：31又は配列番号：33）に由来する核酸配列に一致するか、または前記配列と相補的である、少なくとも15、好ましくは少なくとも30、さらに好ましくは少なくとも50の連続する塩基を含むプロープである。前記のようなプロープは分析的検出が可能な試薬で標識して前記プロープの識別を容易にすることができる。有用な試薬には、放射性同位元素、蛍光色素、および検出可能な生成物の形成を触媒し得る酵素が含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらのプロープを用いて、当業者は、ヒト、哺乳類または他の動物供給源から対象のタンパク質をコードするゲノムDNA、cDNAまたはRNAポリヌクレオチドの相補的なコピーを単離し、近縁配列、例えば前記のファミリー、タイプおよび/またはサブタイプに属するまた別のメンバーについて、前記の供給源をスクリーニングすることができるであろう。

【0028】

多くの場合、単離されるcDNA配列は不完全で、ポリペプチドをコードする領域は短く（通常は5'末端で）切断されているであろう。完全長cDNAを得るために、または短いcDNAを伸長させるために、いくつかの方法が利用可能である。そのような配列は、部分的なヌクレオチド配列を用い、上流の配列（例えばプロモーターおよび調節エレメント）を検出するための当技術分野で公知の種々の方法を用いて伸長させることができる。例えば、使用され得るある方法は、cDNA末端迅速増幅法（RACE；例えば以下を参照されたい：Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988) 85: 8998 - 9002）に基づく。前記技術の最近の改変（例えばマラソン（Marathon）（商標）技術（Clontech Laboratories Inc.）により例示される）は、より長いcDNAの検索を顕著に単純化した。わずかに異なる技術（“制限部位”PCRと称される）では、普遍的プライマーを用いて既知の遺伝子座に近接する未知の核酸配列が検索される（G. Sarkar (1993) PCR Methods Applic. 2: 318 - 322）。逆PCRもまた、既知の領域に基づく多様なプライマーを用いた配列の増幅または伸長に用いることができる（T. Triglia et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 8186）。使用できる別の方法は捕捉PCRで、前記は、ヒトおよび酵母の人工染色体DNAで既知配列に近接するDNAフラグメントのPCR増幅を含む（M. Lagerstrom et al. (1991) PCR Methods Applic

. 1: 111 - 119)。未知の配列を検索するために利用可能な別の方法はパーカーの方法である (J.D. Parker et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 3055 - 3060)。さらに、ゲノムDNAを少しずつ移動して調べるためにPCR、入れ子 (nested) プライマーおよびプロモーターファインダー™ (PromoterFinder™) ライブラリー (Clontech, Palo Alto, CA) を用いてもよい。この方法ではライブラリーのスクリーニングが不要で、イントロン/エクソン結合部の発見に有用である。

【0029】

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

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

【0030】

本発明の核酸分子はまた組織分布同定 (tissue localisation) のために貴重である。そのような技術は、ポリペプチドをコードするmRNAの検出によって組織中の前記ポリペプチドの発現パターンの決定を可能にする。これらの技術には *in situ* ハイブリダイゼーション技術およびヌクレオチド増幅技術 (例えばPCR) が含まれる。これらの研究から得られる結果は、生物内での前記ポリペプチドの正常な機能を示唆する。さらに、変異遺伝子によってコードされるmRNAの発現パターンと正常mRNA発現パターンとの比較研究によって、変異ポリペプチドの疾患における役割に対する貴重な洞察が提供される。そのような不適切な発現は時間的、位置的または量的性質を有する場合もある。

【0031】

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

本発明のポリペプチドは、宿主細胞内に含まれるベクター中の前記ポリペプチドをコードする核酸分子の発現によってリコンビナント形態で調製することができる。前記のような発現方法は当業者によく知られており、以下の文献により詳細に記述され得る：Sambrook et al. (上掲書) および Fernandez & Hoeffler (1998, eds. "Gene expression systems. Using nature for the art of expression", Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto)。

【0032】

一般的には、要求される宿主でポリペプチドを生成させるために核酸分子の維持、増殖

10

20

30

40

50

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

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

10

20

30

40

50

【0033】

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

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子の宿主細胞への導入は、多くの標準的な実験室マニュアル（例えば、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) および上掲書（Sambrook et al.））に記載された方法によって達成できる。特に適切な方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン仲介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、陽イオン脂質仲介トランスフェクション、エレクトロポレーション、トランスダクション、擦過ローディング(scrape loading)、弾道導入または感染が含まれる（以下を参照されたい：Sambrook et al. (1989) 上掲書；Ausbel et al. (1991) 上掲書；Spector, Goldman & Leonard, (1998)）。真核細胞では、発現系は、その系の要求に応じて一過性（例えば、エピソーム性）又は永続的（染色体組込み）であり得る。

【0034】

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

コントロール配列の他に、宿主細胞の増殖に関連して前記ポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することが望ましい場合がある。調節配列の例は、化学的または物理的刺激（調節化合物の存在を含む）または多様な温度もしくは代謝条件にตอบสนองして遺伝子の発現を増加させたり低下させたりする配列である。調節配列は、ベクターの非翻訳領域、例えばエンハンサー、プロモーター並びに5'および3'非翻訳領域である。これらは、宿主細胞タンパク質と相互作用して、転写および翻訳を実行する。そのような調節配列は、その強さおよび特異性を変化させることができる。用いられるベクター系および宿主に依存して、多くの適切な転写および翻訳エレメント（構成性および誘発性プロモーターを含む）を用いることができる。例えば、細菌系でクローニングするときは、誘発性プロモーター、例えばBluescriptファージミド（Stratagene, La Jolla, CA）またはpSport 1（商標）プラスミド（Gibco BRL）などのハイブリッドlacZプロモーターを用いることができる。バキュロウイルスポリヘドリン(polyhedrin)プロモーターは昆虫細胞で用い

ることができる。植物細胞ゲノムに由来するプロモーターまたはエンハンサー（例えば熱ショック、RUBISCOおよび貯蔵タンパク質遺伝子）または植物ウイルスに由来するプロモーターまたはエンハンサー（例えばウイルスプロモーターまたはリーダー配列）は、ベクターへクローニングすることができる。哺乳類細胞系では、哺乳類遺伝子由来または哺乳類ウイルス由来のプロモーターが好ましい。配列の多数コピーを含む細胞株の作製が必要な場合、SV40またはEBVをベースにしたベクターを適切な選択マーカーとともに用いることができる。

【0035】

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

10

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

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

20

【0036】

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

30

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

40

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

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

【0037】

50

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

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

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

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

【0038】

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

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

【0039】

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

適切なレポーター分子または標識 (前記は検出を容易にするために用いることができる) には、放射性核種、酵素および蛍光、化学発光または色素生産性物質の他に基質、コファクター、阻害剤、磁性粒子などが含まれる。

【0040】

10

20

30

40

50

本発明の核酸分子はまたトランスジェニック動物（特にげっ歯類動物）の作製に用いることができる。そのようなトランスジェニック動物は本発明の別の特徴を構成する。これは、体細胞の改変によって局部的に、または遺伝性改変を導入する生殖細胞系列療法によって実施することができる。前記のようなトランスジェニック動物は、本発明のポリペプチドのモジュレーターとして有効な薬剤分子のための動物モデルを作製するために特に有用であろう。

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

10

【0041】

所望の場合には、可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に本発明のポリペプチドをコードする配列を連結させることにより特殊化したベクター構築物も、タンパク質の精製を容易にするために用いることができる。そのような精製促進ドメインの例には、金属キレートペプチド（例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAGS伸長/アフィニティー精製システム（Immunex Corp., Seattle, WA）で用いられるドメイン）が含まれる。切断可能なリンカー配列（例えばXA因子またはエンテロキナーゼ（Invitrogen, San Diego, CA）に特異的なもの）を精製ドメインと本発明のポリペプチドとの間に包含させて、精製を容易にすることに用いてもよい。そのような発現ベクターの1つは、チオレドキシシンまたはエンテロキナーゼ切断部位に先行するいくつかのヒスチジン残基と融合させた本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質の発現を提供する。ヒスチジン残基は、IMAC（固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィー；J. Porath et al. (1992) Prot. Exp. Purif. 3: 263 - 281）により精製を容易にし、一方、チオレドキシシンまたはエンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質からポリペプチドを精製するための手段を提供する。融合タンパク質を含むベクターについての考察は以下で提供される：D.J. Kroll et al. (1993) DNA Cell Biol. 12: 441 - 453）。

20

30

【0042】

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

40

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

アゴニスト化合物またはアンタゴニスト化合物は、例えば細胞、無細胞調製物、化学物質ライブラリーまたは天然生成物の混合物から単離することができる。これらのアゴニストまたはアンタゴニストは天然または改変された基質、リガンド、酵素、レセプターまた

50

は構造的もしくは機能的模倣物質であってよい。前記のスクリーニング技術の適切な概論のためには以下を参照されたい：Coligan et al.(1991) Current Protocols in Immunology 1(2) : Chapter 5。

【0043】

本発明のINSP017ポリペプチドは、神経学的プロセス（例えば、CNS及びPNSの軸索誘導、ニューロン疾患）及び神経系の発達又は調節を含む種々の生理学的及び病理学的プロセスを調節してもよい。このように、INSP017ポリペプチドの生物活性は、種々の適したアッセイを用いてこのような調節性活性の研究を可能にする系で試験できる。

例えば、細胞増殖阻害を観察するために、固体又は液体培地を使用できる。固体培地において、増殖阻害を起こす細胞は、形成されるコロニーの大きさを比較することによって対象細胞群から容易に選択できる。液体培地において、増殖阻害は、培地の濁度又はDNAの標識化チミジンの組み込みを測定することによってスクリーニングできる。典型的には、ヌクレオシド類似体の新たに合成したDNAへの組み込みは、細胞の集合における増殖（すなわち、活性細胞増殖）を測定するために利用できる。例えば、プロモデオキシウリジン（BrdU）は、DNA標識化試薬として利用でき、抗-BrdUマウスモノクローナル抗体は、検出試薬として利用できる。この抗体は、組み込まれたプロモデオキシウリジンを有するDNAを含む細胞にのみ結合する。免疫蛍光法、免疫組織化学的方法、ELISA、及び比色定量法等の多くの検出方法は、このアッセイと組み合わせ使用してもよい。プロモデオキシウリジン（BrdU）及び抗-BrdUマウスモノクローナル抗体を含むキットは、ベーリンガー・マンハイム（インディアナポリス、IN）から市販されている。

10

20

【0044】

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

（a）本発明の第一の特徴のポリペプチドをその表面に発現している細胞を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で被検化合物と接触させる工程であって、前記ポリペプチドは、前記化合物とポリペプチドとの結合に应答して検出可能なシグナルを提供することができる第二の成分と結合されており；さらに

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

30

【0045】

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

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

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

40

さらに好ましい態様では、上記に述べた一般的な方法はさらに、前記ポリペプチドに対する標識または非標識リガンドの存在下でアゴニストまたはアンタゴニストの同定を実施する工程を含むことができる。

【0046】

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

本発明のポリペプチドをその表面に有する細胞とリガンドとの結合または前記のポリペプチドを含む細胞膜とリガンドとの結合の抑制を、前記ポリペプチドとの結合を許容する条件下で候補化合物の存在下で決定し、さらに前記ポリペプチドに結合したリガンドの量を決定する。リガンドの結合の減少をひき起こすことができる化合物はアゴニストまたは

50

アンタゴニストであると考えられる。好ましくは前記リガンドは標識される。

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

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

(b) 前記全細胞または細胞膜と結合した標識リガンドの量を測定する工程；

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

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

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

10

【0047】

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

20

上記に述べた態様のある場合には単純な結合アッセイを用いてもよい。この場合、テスト化合物のポリペプチド保持表面への付着が直接または間接的にテスト化合物と結合させた標識手段によって検出されるか、または標識競合物質との競合を含むアッセイで検出される。別の態様では、競合薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この場合、ポリペプチドと特異的に結合することができる中和抗体がテスト化合物と結合について競合する。このようにして、前記抗体を用いて前記ポリペプチドに対して特異的な結合親和性を保有する一切のテスト化合物の存在を検出することができる。

【0048】

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

30

【0049】

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

40

本発明のポリペプチドを用いて、膜結合レセプターまたは可溶性レセプターを当技術分野で公知の標準的なレセプター結合技術により同定することができる。前記標準的な技術は、例えばリガンド結合アッセイおよび架橋アッセイであり、そのようなアッセイでは、ポリペプチドは放射性同位体で標識されているか、化学的に改変されているか、またはその検出もしくは精製を容易にするペプチド配列と融合されており、推定上のレセプター供給源(例えば細胞の組成物、細胞膜、細胞上清、組織抽出物または体液)とインキュベートされる。結合有効性は、生物物理的技術、例えば表面プラズモン共鳴および分光法を用

50

いて測定することができる。結合アッセイは、レセプターの精製およびクローニングのために用いることができるが、ポリペプチドとそのレセプターとの結合に競合する前記ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためにも用いることができる。スクリーニングアッセイを実施する標準的方法は当技術分野ではよく理解されている。

【0050】

本発明はまた、上記で述べたアゴニスト、アンタゴニスト、リガンド、レセプター、基質、酵素を同定する方法で有用なスクリーニングキットを含む。

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

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

本明細書で用いられる専門用語にしたがえば、ポリペプチド、核酸、リガンドまたは化合物{X}を含む組成物は、組成物中のX+Yの合計の少なくとも85質量%がXである場合は不純物(本明細書中ではY)を“実質的に含まない”。好ましくはXは、組成物中のX+Yの合計の少なくとも約90質量%を、より好ましくは少なくとも約95質量%、98質量%または99質量%を構成する。

【0051】

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

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

【0052】

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

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

治療用組成物中の医薬的に許容できる担体は、さらに液体、例えば水、生理食塩水、グリセロールおよびエタノールを含むことができる。さらに、助剤(例えば湿潤剤または乳

10

20

30

40

50

化剤、pH緩衝物質など)が前記組成物中に存在していてもよい。そのような担体は、患者が摂取できるように前記医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁剤などとして製剤化することを可能にする。

【0053】

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

本発明で用いられる医薬組成物は、多数の経路(経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、硬膜下腔内、心室内、経皮適用(例えばW098/20734を参照)、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、腔内または直腸的手段が含まれるが、ただしこれらに限定されない)によって投与できる。遺伝子銃またはハイポスプレーもまた、本発明の医薬組成物の投与に用いることができる。典型的には、本治療用組成物は、注射用物質(液体溶液または懸濁剤のいずれか)として調製できる。注射前に液体賦形剤中で溶液または懸濁剤とするために適した固体を調製することもできる。

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

本発明のポリペプチドの活性が特定の疾患状態で過剰である場合には、いくつかのアプローチが利用可能である。あるアプローチは、医薬的に許容できる担体とともに上記のような阻害化合物(アンタゴニスト)を、前記ポリペプチドの機能阻害に有効な量で対象者に投与することを含む(前記化合物による前記機能阻害は、例えばリガンド、基質、酵素、レセプターの結合を遮断するか、または第二のシグナルを阻害し、それによって異常な症状を緩和することによって達成される)。好ましくは、前記アンタゴニストは抗体である。最も好ましくは、そのような抗体は、先に記載したようなその免疫原性を最少にするキメラ抗体および/またはヒト化抗体である。

【0054】

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

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

【0055】

さらに、本発明のポリペプチドの発現は、そのコードmRNA配列に特異的なリボザイムを用いることによって妨げることができる。リボザイムは、天然または合成であり得る触媒的活性型のRNAである(例えば以下を参照されたい: N. Usman et al., Curr. Opin. Struct. Biol.(1996) 6(4): 527 - 533)。合成リボザイムをデザインして、選択した位置でmRNAを特異的に切断し、それによってmRNAの機能的ポリペプチドへの翻訳を妨げることができる。リボザイムは、通常RNA分子で見出されるような天然のリン酸リボース骨格および

10

20

30

40

50

天然の塩基から合成することができる。或いは、リボザイムは、非天然の骨格（例えば2'-0-メチルRNA）を用いて合成して、リボヌクレアーゼ分解から保護することができる。これらは改変塩基を含んでいてもよい。

RNA分子は細胞内安定性および半減期を増加させるために改変することができる。可能な改変には、RNA分子の5'および/または3'末端へのフランキング配列の付加、または分子の骨格内でホスホジエステル結合に代わるホスホロチオエートまたは2'-0-メチルの使用が含まれるが、ただしこれらに限定されない。この概念はPNAの生成にも受け継がれ、さらに非慣用塩基（例えばイノシン、ケオシン(gueosine)およびプトシン(butosine)（アセチル-、メチル-、チオ-も同様に）、および同様に改変された形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンで、これらは内因性エンドヌクレアーゼによって容易に認識されないようなものである）の包含によってPNA分子の全てに前記概念を広げることができる。

10

【0056】

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

遺伝子治療を用い、対象者の関連する細胞による本ポリペプチドの内因性生成を行わせることができる。遺伝子治療は、不完全な遺伝子を修正した治療用遺伝子と置き換えることによって、前記ポリペプチドの不適切な生成を永久的に治療するために用いられる。

20

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

治療用遺伝子は患者に投与するために典型的には“パッケージング”されている。遺伝子デリバリー賦形剤はリポソームのような非ウイルス、または、例えばK.L. Berkner (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 39 - 66に記載されたアデノウイルスのような複製欠損ウイルスまたはN. Muzyczka (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 97 - 129および米国特許第5,252,479号に記載されたアデノ付随ウイルス(AAV)ベクターであり得る。例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、複製欠損レトロウイルスベクターで発現させるために操作を施すことができる。次にこの発現構築物を単離し、前記ポリペプチドをコードするRNAを含有するレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入したパッケージ細胞に導入することができる。その結果、前記パッケージ細胞は対象の遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を産生することができるようになる。これらのプロデューサー細胞は *in vivo* で細胞を操作するために、さらに *in vivo* でポリペプチドを発現させるために対象者に投与することができる（以下を参照されたい： *Gene Therapy and Other Molecular Genetic - based Therapeutic Approaches*, Chapter 20（およびその中に引用された文献）、“ *Human Molecular Genetics* ” (1996) T. Strachan & A.P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd.）。

30

40

【0057】

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

本発明のポリペプチドまたは核酸分子が疾患をひき起こす原因物質である場合には、本発明は、前記疾患をひき起こす原因物質に対する抗体を生成するワクチンとして用いることができる。

本発明のワクチンは予防的（すなわち感染を防ぐ）であっても治療的（すなわち感染後の疾患を治療する）であってもよい。そのようなワクチンは、免疫性を付与する抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質または核酸を、通常は上記で述べた医薬的に許容できる

50

担体と組合せて含む。前記担体には、それ自体で組成物を投与される個体に対して有害な抗体の産生を誘発しない担体のいずれもが含まれる。さらに、これらの担体は免疫刺激剤（“アジュバント”）として機能してもよい。さらにまた、前記抗原または免疫原は、細菌の類毒素（例えばジフテリア、破傷風、コレラ、H.ピロリ菌（pyroli））および他の病原体と結合させることができる。

ポリペプチドは胃で分解されるので、ポリペプチドを含むワクチンは好ましくは非経口的に（例えば皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射）投与される。非経口投与に適した製剤には、水性および非水性滅菌注射溶液（前記は抗酸化剤、緩衝剤、抗菌剤および製剤を受容者の血液に対し等張にする溶質を含むことができる）、並びに水性および非水性滅菌懸濁剤（前記は分散剤または粘稠剤を含むことができる）が含まれる。

10

【0058】

本発明のワクチン製剤は単位用量または複数単位用量容器で提供されてもよい。例えば封入したアンプルおよびバイアルは、使用直前に滅菌された液状担体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。投与量はワクチンの比活性に依存し、日常的な検査で容易に決定することができる。

本発明はまた、診断薬としての本発明の核酸分子の使用に関する。本発明の核酸分子により特徴付けられ、機能不全に付随する遺伝子の変異型の検出は、前記遺伝子の過小発現、過剰発現または位置的もしくは時間的発現の変化から生じる疾患の診断、または疾患に対する感受性の診断に付け加えることができるか、またはそれらを明確にすることができる診断ツールを提供する。前記遺伝子に変異を保有する個体は、種々の技術によってDNA

20

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

【0059】

ある態様では、本発明のこの特徴は、本発明のポリペプチドをコードする天然の遺伝子の発現レベルを評価し、さらに前記発現レベルをコントロールのレベルと比較することを含む、患者における疾患を診断する方法を提供する（ここで前記コントロールレベルと異なるレベルは疾患を示唆する）。前記方法は以下の工程を含む：

30

a) 本発明の核酸分子と核酸プローブとの間でハイブリッド複合体の形成を可能にするストリンジェントな条件下で、患者由来の組織サンプルを前記核酸プローブと接触させる工程；

b) コントロールサンプルを工程 a) で用いた条件と同じ条件下で前記プローブと接触させる工程；および、

c) 前記サンプル中のハイブリッド複合体の存在を検出する工程；

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

40

本発明のさらなる特徴は、以下の工程を含む診断方法を含む：

a) 疾患について検査される患者から組織サンプルを入手する工程；

b) 前記組織サンプルから本発明の核酸分子を単離する工程；および、

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

【0060】

上記に記載した方法における核酸分子の検出を補助するために、増幅工程、例えばPCRの使用を含むことができる。

正常な遺伝子型と比較すると、増幅生成物におけるサイズの変化によって、欠失および

50

挿入が検出される。点変異は、増幅DNAを本発明の標識RNAとハイブリダイズさせるか、あるいは本発明の標識アンチセンスDNA配列とハイブリダイズさせることによって同定することができる。完全にマッチした配列は、RNase消化によって、または溶融温度における差異を評価することによって、ミスマッチを有する二重鎖と区別することができる。DNAをストリンジェントな条件下で前記DNAとハイブリダイズする核酸プローブと接触させてハイブリッド二重鎖分子を形成させ（前記ハイブリッド二重鎖は、疾患に付随する変異に対応するいずれかの部分で前記核酸プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分を有する）、DNA鎖の対応する部分における疾患付随変異の有無を示すものとして、前記プローブ鎖のハイブリダイズしていない部分の有無を検出することによって、患者における変異の有無を検出することができる。

10

前記のような診断は特に出生前検査で有用であり、新生児検査においてすら有用である。

【0061】

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

20

DNA配列の相違はまた、変性剤の存在下または非存在下でのゲル内のDNAフラグメントの電気泳動移動度における変化によって、または直接DNAシーケンシング（例えば、Myers et al., Science (1985) 230:1242）によって検出することができる。特定の位置における配列の変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えばRNaseおよびS1保護）または化学切断法（Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85:4397-4401を参照）によって明らかにすることができる。

30

【0062】

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

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

40

【0063】

ある態様では、前記アレイは以下の文献に記載された方法にしたがって調製され使用される（PCT出願W095/11995（Chee et al.）；D.J. Lockhart et al.(1996) Nat. Biotech. 14:1675-1680；M. Schena et al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619）。オリゴヌクレオチド対は2つから100万個を越える範囲で変動し得る。前記オリゴマー

50

は、光誘導化学方法を用いて基板上の指定領域で合成される。基板は紙、ナイロンまたは他のタイプのメンブレン、フィルター、チップ、ガラススライドもしくは他の適切な任意の固相支持体でよい。別の特徴では、オリゴヌクレオチドは、PCT特許出願 (W095/251116, Baldeschweiler et al.) に記載されたように化学的結合方法およびインクジェット適用装置を用いて基板表面で合成することができる。別の特徴では、ドット (またはスロット) プロットに類似する “格子化 (gridded)” アレイを用い、真空系、熱結合方法、UV 結合方法、機械的または化学的結合方法を用いて基質表面に cDNA フラグメントまたはオリゴヌクレオチドを配置し、連結させることができる。アレイ (例えば上記で述べたようなもの) は手動で、または利用可能な装置 (スロットプロットまたはドットプロット装置)、材料 (適切な固相支持体すべて) および機械 (ロボット機器を含む) を用いて作製

10

【0064】

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

20

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

例えば ELISA、RIA および FACS のようなポリペプチドレベルを測定するためのプロトコルは、さらにポリペプチド発現の変化レベルまたは異常レベルを診断するための基礎を提供することができる。ポリペプチド発現の正常値または標準値は、正常な哺乳類対象体 (好ましくはヒト) から得られた体液または細胞抽出物を、複合体形成に適した条件下で前記

30

【0065】

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

40

レポーター分子と共有結合または非共有結合によって結合させることによって標識することができる。当技術分野で公知の多様なレポーター分子を用いることができる (それらのいくつかは上記に記載されている)。

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

【0066】

本発明の診断キットは以下を含むことができる：

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

本発明のある特徴では、診断キットは、ストリンジェントな条件下で本発明の核酸分子とハイブリダイズする核酸プローブを含む第一の容器；核酸分子を増幅させるために有用なプライマーを含む第二の容器；および疾患の診断を容易にするために前記プローブおよびプライマーの使用についての指示書を含むことができる。前記キットはさらに、ハイブリダイズしていないRNAを消化するための試薬を保持する第三の容器を含むことができる。

10

本発明の別の別の特徴では、診断キットは核酸分子のアレイを含み、前記核酸分子の1つが本発明の核酸分子であってもよい。

本発明のポリペプチドを検出するために、診断キットは以下を含むことができる：本発明のポリペプチドと結合する1つまたは2つ以上の抗体；および前記抗体とポリペプチドとの間の結合反応の検出に有用な試薬。

【 0 0 6 7 】

そのようなキットは、以下のような疾患または疾患に対する感受性を診断する場合に有用であろう：特に、細胞増殖性疾患、特に脳腫瘍、神経系腫瘍、新生物、骨腫瘍及び骨髄増殖性疾患、特に顆粒球性白血病、自己免疫/炎症性疾患、心脈管系疾患、神経疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、神経障害、例えばうつ病、精神分裂症、脳損傷、脊髄損傷、神経損傷、発達障害、例えば神経系発達の傷害、神経系炎症、例えば運動ニューロン疾患、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症及び炎症性神経障害、骨疾患、アテローム性硬化症、糸球体腎炎、悪疫質、エイズ、HIV感染、代謝異常、例えば糖尿病、感染症、生殖異常、不妊症、胎児着床不全 (embryo implantation failure)、妊娠障害及び分娩合併症並びに他の病理学的状態、特にネトリン受容体が関係するもの。

20

本発明の種々の特徴および態様は、特に INSP017ポリペプチドへの言及を有する実施例を介してこれからより詳細に説明されるであろう。

細部の改変は本発明の範囲を逸脱することなく実施できることは理解されよう。

【 0 0 6 8 】

実施例

実施例 1 : INSP017

配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：10、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16、配列番号：18、配列番号：20、配列番号：22、配列番号：24、配列番号：26、配列番号：28、および配列番号：30を結合させることにより得られるポリペプチド配列 (INSP017の連続エクソンの翻訳を示す (図 1)) をNCBI-nrデータベースに対するBLAST相同性検索の検索物 (query) として用い、上位10個の結果を示す (図 2) 。最高適合物はUNC-5ネトリン受容体の配列を示す (図 3) 。

INSP017は、膜貫通型タンパク質、好ましくはネトリン受容体として機能することが考えられる。これらの実験の予測は、関係する実験により続いて確認されるであろう。例えば、多くの異なるアッセイは、ネトリン受容体活性について試験するために使用してもよい。

40

実施例 2

1 . INSP017のクローニング

1 . 1 cDNAライブラリー

ヒトcDNAライブラリー (バクテリオファージラムダ () ベクターの状態) は、StratageneもしくはClontechから購入するか、またはSerono Pharmaceutical Research Instituteで製造元 (Stratagene) のプロトコルにしたがって ZAPもしくは GT10ベクターの状態に調製した。バクテリオファージ DNAは、感染させた大腸菌宿主株の小規模培養から製造元 (Promega, Corporation, Madison WI.) の指示にしたがいWizard Lambda Preps

50

DNA精製系を用いて調製した。使用ライブラリーおよび宿主株のリストは表 I に示されている。5つの異なるライブラリーの8つのプール (A-H) (100ng/ μ LファージDNA) をその後のPCR反応に用いた。

【0069】

1.2 ファージライブラリーDNAに由来する実質上cDNAのPCR

INSP017 (図4) の3つのエクソンをコードするcDNAは、遺伝子特異的クローニングプライマー (CP1およびCP2、図4および表2) を用いて357bpのPCR増幅生成物として得られた。PCRは、以下を含む最終容積50 μ Lで以下のようにプログラムしたMJリサーチDNAエンジンを用いて実施した (1XのAmpliTaq (登録商標) 緩衝液、200 μ MのdNTP、各々50ピコモルのクローニングプライマー、2.5単位のAmpliTaq (登録商標) (Perkin Elmer) および各々100ngのファージライブラリープールDNA; 94 $^{\circ}$ C、1分; 94 $^{\circ}$ C、1分、x $^{\circ}$ C、y分および72 $^{\circ}$ Cの40サイクル (ここでxは最低T_m-5 $^{\circ}$ Cで、yは生成物1kbにつき1分である); 続いて72 $^{\circ}$ Cで1分の1サイクル、さらに4 $^{\circ}$ Cのホールディングサイクル)。

増幅生成物は、1xのTAE緩衝液 (Life Technologies) の0.8%のアガロースゲルで可視化し、予想分子量で移動したPCR生成物をWizard PCR Preps DNA精製系 (Promega) を用いてゲルから精製した。50 μ Lの滅菌水に溶出させたPCR生成物を直接サブクローニングするか、または-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

1.3 PCRのための遺伝子特異的クローニングプライマー

実質上cDNAの完全長を増幅するために、プライマーデザイナーソフトウェア (Scientific & Educational Software, PO Box 72045, Durham, NC 27722-2045, USA) を用いて18から25塩基の長さを有するPCRプライマー対をデザインした。PCRプライマーは、55 \pm 10に近いT_mおよび40-60%のGC含量をもつように最適化した。標的配列INSP017に対して高い選択性を有するプライマーを選別した (ほとんどまたは全く非特異的プライミングを許さない)。

【0070】

1.4 PCR生成物のサブクローニング

PCR生成物をトポイソメラーゼI改変クローニングベクター (pCR4blunt TOP0) で、インビトロゲン社 (Invitrogen Corporation) から購入したZero bluntクローニングキット (cat. No. K2875) を用い製造元の特定する条件を用いてサブクローニングした。簡単に記せば、ヒトライブラリープールA増幅に由来する4 μ Lのゲル精製PCR生成物を、1 μ LのTOP0ベクターおよび1 μ Lの塩溶液とともに室温で15分インキュベートした。続いて前記反応混合物で大腸菌株TOP10 (Invitrogen) を以下のように形質転換した: ワンショットTOP10細胞の50 μ Lアリコート氷上で融解し、2 μ LのTOP0反応物を添加した。前記混合物を氷上で15分インキュベートし、続いて正確に30秒42 $^{\circ}$ Cでインキュベートしてヒートショック処理した。サンプルを氷上に戻し、250 μ Lの温SOC媒体 (室温) を添加した。振盪しながら (220rpm) サンプルを1時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。続いて形質転換混合物をアンピシリン (100 μ g/mL) 含有L-ブロス (LB) 平板に播種し、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。cDNA挿入物を含むアンピシリン耐性コロニーをコロニーPCRで同定した。

1.5 コロニーPCR

滅菌つま楊枝を用いてコロニーを50 μ Lの滅菌水に接種した。続いて10 μ Lの接種物を上記で述べたように (ただし使用したプライマーはT3およびT7であった) 20 μ Lの全反応容積でPCRに付した。サイクリング条件は以下のとおりであった: 94 $^{\circ}$ Cで2分; 94 $^{\circ}$ C、30秒、47 $^{\circ}$ C、30秒および72 $^{\circ}$ C 1分の30サイクル; 72 $^{\circ}$ C、7分の1サイクル。続いて更なる分析の前にサンプルを4 $^{\circ}$ Cで維持した (ホールディングサイクル)。

PCR反応生成物を1xのTAE緩衝液中で1%アガロースゲルで分析した。予想されるPCR生成物サイズ (357bpのcDNA + 105bp (マルチクローニングサイトまたはMCSのため)) を示すコロニーを、アンピシリン (50 μ g/mL) 含有L-ブロス (LB) の5mLで振盪しながら (220rpm) 一晩37 $^{\circ}$ Cで増殖させた。

1.6 プラミドDNAの調製およびシーケンシング

MiniprepプラスミドDNAをQiaprep Turbo9600自動システム (Qiagen) またはWizard Plus

10

20

30

40

50

s SV Miniprepキット (Promega Cat.# 1460) を用い製造元の指示にしたがって5mLの培養物から調製した。プラスミドDNAを100 μ Lの滅菌水に溶出させた。DNA濃度はエッペンドルフB0分光計を用いて測定した。BigDye Terminatorシステム (Applied Biosystems Cat.# 4390246) を用い製造元の指示にしたがいながら、プラスミドDNA (200 - 500ng) をT7およびT3プライマーを用いDNAシーケンシングに付した。シーケンシング反応物をDye-Exカラム (Qiagen) またはMontage SEQ 96クリーンアッププレート (Millipore cat.#LSKS09624) を用いて精製し、続いてApplied Biosystems 3700シーケンサーで分析した。

【 0 0 7 1 】

1 . 7 RACE PCRを用いる INSP017の全長コード配列の同定

INSP017 ORFの推定配列は、開始コドンを含まず、またコード配列の3'末端の停止コドンも欠いている (図4)。RACE PCRは、従って全長コード配列を同定するために推定の5'及び3'末端を伸長するために使用した。RACE PCRは、製造元の指示にしたがってGene Racerキット (Invitrogen) を用いて精巢由来のRACEレディcDNA (Invitrogen cat. No. L1510-13) で実施した。5'末端の増幅のために、以下を含む50 μ Lの反応容積で、第1PCRを行った (1 μ LのRACEレディcDNA、5 μ Lの10 \times 高忠実度緩衝剤、1 μ LのdNTP (10mM)、2 μ Lの50mMのMgSO₄、3 μ LのGeneRacer 5'1プライマー (10 μ M)、1 μ Lのリバース遺伝子特異的プライマー (63765-GR1-5') (10 μ M) 及び2.5単位 (0.5 μ L) のプラチナTaq DNAポリメラーゼHi Fi (Invitrogen))。サイクリング条件は以下の通りであった：94 2分；5サイクルの94 30秒及び72 2分；5サイクルの94 30秒及び70 5分；25サイクルの94 30秒、65 30秒及び68 5分；68 で10分間の最終伸長及び4 のホールディングサイクル。次いで、1 μ Lの増幅反応を、最終容積50 μ Lでプライマーを除いて上記と同じ試薬で行ったnested PCR用の鑄型として使用した。Nested PCR用プライマーは、1 μ LのGeneRacer 5' nestedプライマー (10 μ M) 及び1 μ Lのリバース nested遺伝子特異的プライマー (63765-GR1nest-5') (10 μ M) であった。サイクリング条件は以下の通りであった：94 2分；25サイクルの94 30秒、65 30秒及び68 5分；68 で10分間の最終伸長及び4 のホールディングサイクル。PCR生成物をゲル精製し、上述のpCR4-bluntTOP0ベクターにサブクローニングした。3'末端の増幅のために、プライマーが以下の通りであることを除いて、5' RACEと同じ反応条件を使用した：PCR1について、3 μ LのGene Racer 3'プライマー (10 μ M) 及び1 μ Lの63765-GR1-3'プライマー (10 μ M)。PCR2 (nested PCR) について、1 μ LのGene Racer nested 3'プライマー (10 μ M) 及び1 μ Lの63765-GR1nest-3'プライマー (10 μ M))。すべてのプライマーを表IIに示す。

【 0 0 7 2 】

1 . 8 PCRによる INSP017の全長コード配列のクローニング

RACE PCRによって同定された INSP017をコードする全長cDNAを図5に示す。1 μ LのRACEレディcDNA、5 μ Lの10 \times 高忠実度緩衝剤、1 μ LのdNTP (10mM)、2 μ Lの50mMのMgSO₄、0.5 μ Lの遺伝子特異的プライマー63765-FL-F (50ピコモル)、1 μ Lのリバース遺伝子特異的プライマー63765-FL-R (50ピコモル) 及び2.5単位 (0.5 μ L) のプラチナTaq DNAポリメラーゼHi Fi (Invitrogen) を含む50 μ LのPCR反応混合物中でヒトGene Racerレディ精巢cDNAからPCRによってINSP017のORFをクローニングした。サイクリング条件は、94 2分；35サイクルの94 30秒、65 30秒及び68 5分；68 で10分間の最終伸長及び4 のホールディングサイクルであった。1 \times TAE緩衝剤 (Life Technologies) で0.8%のアガロースゲルで増幅産物を可視化し、推定分子量 (2929bp) で泳動したPCR産物をWizard PCR Preps DNA精製システム (Promega) を用いて前記ゲルから精製した。PCR産物を50 μ Lの滅菌水中で溶離し、セクション1.4に記載されるpCR4 blunt TOP0ベクターにサブクローニングした。いくつかのアンピシリン耐性コロニーをセクション1.5に記載されるコロニーPCR (増幅反応における伸長時間が3分であることを除いて) に供した。正しいサイズの挿入 (MCSによる2929bp+105bp) を含むコロニーを一晚37 でアンピシリン (50 μ g/mL) を含む5mLのL-Broth (LB) 中で、220rpm (37) で振盪しながら増殖した。Qiaprep Turbo 9600口ボットシステム (Qiagen) 又はWizard Plus SVミニプレップキット (Promega cat. no. 1460) を用い製造元の指示にしたがって、ミニプレッププラスミドDNAを5mLの培養液から調製

し、T3及びT7プライマーとINSP017特異的プライマー(表3)により、200-500ngのミニプレップDNAをセクション1.6に記載される通りにシーケンシングした。得られたプラスミドのマップであるpCR4 TOPO-INSP017(プラスミドID.No.13287)を図6に示す。

【0073】

2. INSP017を含むcDNAライブラリーの同定

CP1およびCP2を用いて得られた正確なサイズ(357bp)で泳動するPCR生成物をライブラリープールA(ライブラリー6、7、8、9及び10)および精巢cDNAで同定した。

10

20

30

【0074】

表I: ヒトcDNAライブラリー

40

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

10

20

30

40

* : ストラタジーン (Stratagene)

** : クローンテック (Clontech)

【 0 0 7 5 】

表II : INSP017クローニングプライマー

50

プライマー	名称	配列 (5'-3')
CP1	3D1	GCG CAT AGC CTA TTT ACG GA
CP2	3D2	TCC TCT ACC ACA GCG AAC AT
GeneRacer 5' 1		GCA CGA GGA CAC UGA CAU GGA CUG A
63765-GR1-5'	1A9	TGA GTC CGA GAG CCG TGC CTG CCT GAT GA T
GeneRacer 5' nested		GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA
63765-GR1nest-5'	1A10	TAT GGT CAG CCC TGG TGT CAA TGT TCT C
GeneRacer 3'		GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G
63765-GR1-3'	3G9	AAT GGA GGC TGG TCT TCC TGG ACA GAG
GeneRacer 3' nested		CGC TAC GTA ACG GCA TGA CAG TG
63765-GR1nest-3'	3G10	GCC TGC AAT GTT CGC TGT GGT AGA G
63765FL-F	9D11	GCA GTC CAG CTC ACA GGT TA
63765FL-R	9D12	CTG GCC ATC ACT CTG TCT CA
T3		
T7		TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

10

【 0 0 7 6 】

表 III : シークエンシングプライマー

20

プライマー	配列 (5'-3')
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
63765 F6	GGA AGT GTG GAG CGA ATG GT
63765 F7	GTC CAG AGC TCG TTC ATG GT
63765 F8	TTG CGT GTC ATG TGC TCC TG
63765 F9	CCA AGT GCA GAC ATC AAT CC
63765 F10	AGC TGA GTA CCA CGG CAA GA
63765 F11	ACC TGT GGT CCT CCA GAC AT
63765 F12	TGT GCC GTG AAG CAA CTG AA

30

【 0 0 7 7 】

配列表

配列番号 : 1 (INSP017 ヌクレオチド配列エクソン1)

1 CTTCCCGAAT CCATCCCATC AGCTCCTGGG ACACTGCCTC ATTTCATAGA
 51 GGAGCCAGAT GATGCTTATA TTATCAAGAG CAACCCTATT GCACTCAGGT
 101 GCAAAGCGAG GCCAGCCATG CAGATATTCT TCAAATGCAA CGGCGAGTGG
 151 GTCCATCAGA ACGAGCACGT CTCTGAAGAG ACTCTGGACG AGAGCTCAG

配列番号 : 2 (INSP017 タンパク質配列エクソン1)

1 LPESIPSAPG TLPHFIEEPD DAYIIKSNPI ALRCKARPAM QIFFKCNGEW
 51 VHQNEHVSEE TLDSSG

40

配列番号 : 3 (INSP017 ヌクレオチド配列エクソン2)

1 GTTTGAAGGT CCGCGAAGTG TTCATCAATG TTACTAGGCA ACAGGTGGAG
 51 GACTTCCATG GGCCCGAGGA CTATTGGTGC CAGTGTGTGG CGTGGAGCCA
 101 CCTGGGTACC TCCAAGAGCA GGAAGGCCTC TGTGCGCATA GCCT

配列番号 : 4 (INSP017 タンパク質配列エクソン2)

1 LKVREVFINV TRQQVEDFHG PEDYWCQCVV WSHLGTSKSR KASVRIAY

50

配列番号：5 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン3)

1 ATTTACGGAA AAACCTTTGAA CAAGACCCAC AAGGAAGGGA AGTTCCCATT
51 GAAGGCATGA TTGTA CTGCTGCA CTGCCGCCA CCAGAGGGAG TCCCTGCTGC
101 CGAG

配列番号：6 (INSP017 -タンパク質配列エクソン3)

1 LRKNFEQDPQ GREVPIEGMI VLHCRPPEGV PAEE

配列番号：7 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン4)

1 GTGGAATGGC TGAAAAATGA AGAGCCCATT GACTCTGAAC AAGACGAGAA
51 CATTGACACC AGGGCTGACC ATAACCTGAT CATCAGGCAG GCACGGCTCT
101 CGGACTCAGG AAATTACACC TGCATGGCAG CCAACATCGT GGCTAAGAGG
151 AGAAGCCTGT CGGCCACTGT TGTGGTCTAC G

10

配列番号：8 (INSP017 -タンパク質配列エクソン4)

1 VEWLKNEEPI DSEQDENIDT RADHNLIRQ ARLSDSGNYT CMAANIVAKR
51 RLSATVVVY V

配列番号：9 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン5)

1 TGAATGGAGG CTGGTCTTCC TGGACAGAGT GGTCAGCCTG CAATGTTCCG
51 TGTGGTAGAG GATGGCAGAA ACGTTCCCGG ACCTGCACCA ACCCAGCTCC
101 TCTCAATGGT GGGGCCTTTT GTGAGGGAAT GTCAGTGCAG AAAATAACCT
151 GCACTTCTCT TTGTCCTG

20

配列番号：10 (INSP017 -タンパク質配列エクソン5)

1 NGGWSSWTEW SACNVRCGRG WQKRSRTCTN PAPLNGGAF C EGMSVQKITC
51 TSLCPV

配列番号：11 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン6)

1 TGGATGGGAG CTGGGAAGTG TGGAGCGAAT GGTCCGTCTG CAGTCCAGAG
51 TGTGAACATT TGCGGATCCG GGAGTGCACA GCACCACCCC CGAGAAATGG
101 GGGCAAATTC TGTGAAGGTC TAAGCCAGGA ATCTGAAAAC TGCACAGATG
151 GTCTTTGCAT CCTAG

30

配列番号：12 (INSP017 -タンパク質配列エクソン6)

1 DGSWEVWSEW SVC SPECEHL RIRECTAPPP R NGGKFCEGL SQESENCTDG
51 LCILG

配列番号：13 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン7)

1 GCATTGAGAA TGCCAGCGAC ATTGCTTTGT ACTCGGGCTT GGGTGCTGCC
51 GTCGTGGCCG TTGCACTCCT GGTCATTGGT GTCACCCTTT ACAGACGGAG
101 CCAGAGTGAC TATGGCGTGG ACGTCATTGA CTCTTCTGCA TTGACAGGTG
151 GCTTCCAGAC CTTCAACTTC AAAACAGTCC GTCAAG

40

配列番号：14 (INSP017 -タンパク質配列エクソン7)

1 IENASDIALY SGLGAAVVAV AVL VIGVTLY RRSQSDYGVD VIDSSALTGG
51 FQTFNFKTVR QG

配列番号：15 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン8)

50

1 GTAACTCCCT GCTCCTGAAT TCTGCCATGC AGCCAGATCT GACAGTGAGC
 51 CGGACATACA GCGGACCCAT CTGTCTGCAG GACCCTCTGG ACAAGGAGCT
 101 CATGACAGAG TCCTCACTCT TTAACCCTTT GTCGGACATC AAAGTGAAAG
 151 TCCAGAGCTC GTTCATGGTT TCCCTGGGAG TGTCTGAGAG AGCTGAGTAC
 201 CACGGCAAGA ATCATTCCAG GACTTTTCCC CATGGAAACA ACCACAGCTT
 251 TAGTACAATG CATCCCAGAA ATAAAATGCC CTACATCCAA AATCTGTCAT
 301 CACTCCCCAC AAGGACAGAA CTGAGGACAA CTGGTGTCTT TGGCCATTTA
 351 GGGGGGCGCT TAGTAATGCC AAATACAG

配列番号 : 16 (INSP017 -タンパク質配列エクソン8)

10

1 NSLLNSAMQ PDLTVSRTYS GPICLQDPLD KELMTESSLF NPLSDIKVKV
 51 QSSFVMSLGV SERAEYHGKN HSRTFPHGNN HSFSTMHPRN KMPYIQNLSS
 101 LPTRTELRTT GVFGHLGGRL VMPNTG

配列番号 : 17 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン9)

1 GGGTGAGCTT ACTCATACCA CACGGTGCCA TCCCAGAGGA GAATTCTTGG
 51 GAGATTTATA TGTCCATCAA CCAAGGTGAA CCCAG

配列番号 : 18 (INSP017 -タンパク質配列エクソン9)

20

1 VSLIPHGAI PEENSWEIYM SINQGEPS

配列番号 : 19 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン10)

1 CCTCCAGTCA GATGGCTCTG AGGTGCTCCT GAGTCCTGAA GTCACCTGTG
 51 GTCCTCCAGA CATGATCGTC ACCACTCCCT TTGCATTGAC CATCCCGCAC
 101 TGTGCAGATG TCAGTTCTGA GCATTGGAAT ATCCATTTAA AGAAGAGGAC
 151 ACAGCAGGGC AAATGGGAG

配列番号 : 20 (INSP017タンパク質配列エクソン10)

1 LQSDGSEVLL SPEVTCGPPD MIVTTPFALT IPHCADVSSE HWNIHLKKRT
 51 QQGKWE

30

配列番号 : 21 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン11)

1 GAAGTGATGT CAGTGGAAGA TGAATCTACA TCCTGTTACT GCCTTTTGGG
 51 CCCCTTTGCG TGTCATGTGC TCCTGGACAG CTTTGGGACC TATGCGCTCA
 101 CTGGAGAGCC AATCACAGAC TGTGCCGTGA AGCAACTGAA GGTGGCGGTT
 151 TTTGGCTGCA TGTCCTGTAA CTCCCTGGAT TACAACCTGA GAGTTTACTG
 201 TGTGGACAAT ACCCCTTGTG CATTTCAG

配列番号 : 22 (INSP017 -タンパク質配列エクソン11)

40

1 EVMSVEDEST SCYCLLDPFA CHVLLDSFGT YALTGEPITD CAVKQLKQAV
 51 FGCMSCNULD YNLRVYCVDN TPCAFQ

配列番号 : 23 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン12)

1 GAAGTGGTTT CAGATGAAAG GCATCAAGGT GGACAGCTCC TGAAGAACC
 51 AAAATTGCTG CATTTCAAAG GGAATACCTT TAGTCTTCAG ATTTCTGTCC
 101 TTGATATTCC CCCATTCTC TGGAGAATTA AACCATTCAC TGCCTGCCAG

配列番号 : 24 (INSP017 -タンパク質配列エクソン12)

1 EVVSDERHQG GQLLEPKLL HFKGNTFSLQ ISVLDIPPFL WRIKPFTACQ

50

配列番号 : 25 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン13)

1 GAAGTCCCGT TCTCCCGCGT GTGGTGCAGT AACCGGCAGC CCCTGCACTG
 51 TGCCTTCTCC CTGGAGCGTT ATACGCCCAC TACCACCCAG CTGTCCTGCA
 101 AAATCTGCAT TCGGCAGCTC AAAGGCCATG AACAGATCCT CCAAGTGCAG
 151 ACATCAATCC TAGAG

配列番号 : 26 (INSP017 -タンパク質配列エクソン13)

1 EVPFSRVWCS NRQLHCAFS LERYTPTTTQ LSKKICIRQL KGHEQILQVQ
 51 TSILE

10

配列番号 : 27 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン14)

1 AGTGAACGAG AAACCATCAC TTTCTTCGCA CAAGAGGACA GCACTTTCCC
 51 TGCACAGACT GGCCCCAAAG CCTTCAAAT TCCCTACTCC ATCAGACAGC
 101 GGATTTGTGC TACATTTGAT ACCCCCAATG CCAAAGGCAA GGAAGTGGCAG
 151 ATGTTAGCAC AGAAAAACAG CATCAACAG

配列番号 : 28 (INSP017 -タンパク質配列エクソン14)

1 SERETITFFA QEDSTFPAQT GPKAFKIPYS IRQRICATFD TPNKKGKDWQ
 51 MLAQKNSINR

20

配列番号 : 29 (INSP017 -ヌクレオチド配列エクソン15)

1 GAATTTATCT TATTTTCGCTA CACAAAGTAG CCCATCTGCT GTCATTTTGA
 51 ACCTGTGGGA AGCTCGTCAT CAGCATGATG GTGATCTTGA CTCCTGGCC
 101 TGTGCCCTTG AAGAGATTGG GAGGACACAC ACGAAACTCT CAAACATTTT
 151 AGAATCCCAG

配列番号 : 30 (INSP017 -タンパク質配列エクソン15)

1 NLSYFATQSS PSAVILNLWE ARHQHDGDL SLACALEEIG RHTKLSNIS
 51 ESQ

30

配列番号 : 31 (INSP017 -ヌクレオチド配列 (最初の推定))

1 CTTCCCGAAT CCATCCCATC AGCTCCTGGG AACTGCCTC ATTTCATAGA
 51 GGAGCCAGAT GATGCTTATA TTATCAAGAG CAACCCTATT GCACTCAGGT
 101 GCAAAGCGAG GCCAGCCATG CAGATATTCT TCAAATGCAA CGGCGAGTGG
 151 GTCCATCAGA ACGAGCACGT CTCTGAAGAG ACTCTGGACG AGAGCTCAGG
 201 TTTGAAGGTC CGCGAAGTGT TCATCAATGT TACTAGGCAA CAGGTGGAGG
 251 ACTTCCATGG GCCCGAGGAC TATTGGTGCC AGTGTGTGGC GTGGAGCCAC
 301 CTGGGTACCT CCAAGAGCAG GAAGGCCTCT GTGCGCATAG CCTATTTACG
 351 GAAAAACTTT GAACAAGACC CACAAGGAAG GGAAGTTCCC ATTGAAGGCA
 401 TGATTGTA CTGACTGCCG CCACCAGAGG GAGTCCCTGC TGCCGAGGTG
 451 GAATGGCTGA AAAATGAAGA GCCCATTGAC TCTGAACAAG ACGAGAACAT
 501 TGACACCAGG GCTGACCATA ACCTGATCAT CAGGCAGGCA CGGCTCTCGG
 551 ACTCAGGAAA TTACACCTGC ATGGCAGCCA ACATCGTGGC TAAGAGGAGA
 601 AGCCTGTCCG CCACTGTTGT GGTCTACGTG AATGGAGGCT GGTCTTCCTG
 651 GACAGAGTGG TCAGCCTGCA ATGTTGCTG TGGTAGAGGA TGGCAGAAAC
 701 GTTCCCGGAC CTGCACCAAC CCAGCTCCTC TCAATGGTGG GGCCTTTTGT
 751 GAGGGAATGT CAGTGCAGAA AATAACCTGC ACTTCTCTTT GTCCTGTGGA
 801 TGGGAGCTGG GAAGTGTGGA GCGAATGGTC CGTCTGCAGT CCAGAGTGTG
 851 AACATTTGCG GATCCGGGAG TGCACAGCAC CACCCCGAG AAATGGGGGC
 901 AAATTCTGTG AAGGTCTAAG CCAGGAATCT GAAAACCTGCA CAGATGGTCT

40

50

951 TTGCATCCTA GGCATTGAGA ATGCCAGCGA CATTGCTTTG TACTCGGGCT
 1001 TGGGTGCTGC CGTCGTGGCC GTTGCAGTCC TGGTCATTGG TGTCACCCTT
 1051 TACAGACGGA GCCAGAGTGA CTATGGCGTG GACGTCATTG ACTCTTCTGC
 1101 ATTGACAGGT GGCTTCCAGA CCTTCAACTT CAAAACAGTC CGTCAAGGTA
 1151 ACTCCCTGCT CCTGAATTCT GCCATGCAGC CAGATCTGAC AGTGAGCCGG
 1201 ACATACAGCG GACCCATCTG TCTGCAGGAC CCTCTGGACA AGGAGCTCAT
 1251 GACAGAGTCC TCACTCTTTA ACCCTTTGTC GGACATCAAA GTGAAAGTCC
 1301 AGAGCTCGTT CATGGTTTTCC CTGGGAGTGT CTGAGAGAGC TGAGTACCAC
 1351 GGCAAGAATC ATTCCAGGAC TTTTCCCAT GGAAACAACC ACAGCTTTAG
 1401 TACAATGCAT CCCAGAAATA AAATGCCCTA CATCCAAAAT CTGTCATCAC 10
 1451 TCCCCACAAG GACAGAACTG AGGACAACCTG GTGTCTTTGG CCATTTAGGG
 1501 GGGCGCTTAG TAATGCCAAA TACAGGGGTG AGCTTACTCA TACCACACGG
 1551 TGCCATCCCA GAGGAGAATT CTTGGGAGAT TTATATGTCC ATCAACCAAG
 1601 GTGAACCCAG CCTCCAGTCA GATGGCTCTG AGGTGCTCCT GAGTCCTGAA
 1651 GTCACCTGTG GTCCTCCAGA CATGATCGTC ACCACTCCCT TTGCATTGAC
 1701 CATCCCGCAC TGTGCAGATG TCAGTTCTGA GCATTGGAAT ATCCATTTAA
 1751 AGAAGAGGAC ACAGCAGGGC AAATGGGAGG AAGTGATGTC AGTGGAAGAT
 1801 GAATCTACAT CCTGTTACTG CCTTTTGGAC CCCTTTGCGT GTCATGTGCT
 1851 CCTGGACAGC TTTGGGACCT ATGCGCTCAC TGGAGAGCCA ATCACAGACT
 1901 GTGCCGTGAA GCAACTGAAG GTGGCGGTTT TTGGCTGCAT GTCCTGTAAC 20
 1951 TCCCTGGATT ACAACTTGAG AGTTTACTGT GTGGACAATA CCCCTTGTGC
 2001 ATTTTCAGGAA GTGGTTTCAG ATGAAAGGCA TCAAGGTGGA CAGCTCCTGG
 2051 AAGAACCAAA ATTGCTGCAT TTCAAAGGGA ATACCTTTAG TCTTCAGATT
 2101 TCTGTCTTGG ATATTCCTGG ATTCCTCTGG AGAATTAAC CATTCACTGC
 2151 CTGCCAGGAA GTCCCCTTCT CCCGCGTGTG GTGCAGTAAC CGGCAGCCCC
 2201 TGCACCTGTC CTTCTCCCTG GAGCGTTATA CGCCCACTAC CACCCAGCTG
 2251 TCCTGCAAAA TCTGCATTCC GCAGCTCAA GGCCATGAAC AGATCCTCCA
 2301 AGTGCAGACA TCAATCCTAG AGAGTGAACG AGAAACCATC ACTTTCTTCG
 2351 CACAAGAGGA CAGCACTTTC CCTGCACAGA CTGGCCCCAA AGCCTTCAA
 2401 ATTCCCTACT CCATCAGACA GCGGATTTGT GCTACATTTG ATACCCCAA 30
 2451 TGCCAAAGGC AAGGACTGGC AGATGTTAGC ACAGAAAAAC AGCATCAACA
 2501 GGAATTTATC TTATTTTCGCT ACACAAAGTA GCCCATCTGC TGTCATTTTG
 2551 AACCTGTGGG AAGCTCGTCA TCAGCATGAT GGTGATCTTG ACTCCCTGGC
 2601 CTGTGCCCTT GAAGAGATTG GGAGGACACA CACGAAACTC TCAAACATTT
 2651 CAGAATCCCA G

配列番号：32 (INSP017ポリペプチド配列 (最初の推定))

1 LPESIPSAPG TLPHFIEEPD DAYIIKSNPI ALRCKARPAM QIFFKNGEW
 51 VHQNEHVSEE TLDESSGLKV REVFINVTRQ QVEDFHGPEL YWCQCVASH 40
 101 LGTSKSRKAS VRIAYLRKNF EQDPQGREVP IEGMIVLHCR PPEGVPAAEV
 151 EWLKNEEPID SEQDENIDTR ADHNLIIRQA RLSDSGNYTC MAANIVAKRR
 201 SLSATVVVYV NGGWSSWTEW SACNVRGGRG WQKRSRTCTN PAPLNGGAFD
 251 EGMSVQKITC TSLCPVDGSW EVWSEWSVCS PECEHLRIRE CTAPPPRNGG
 301 KFCEGLSQES ENCTDGLCIL GIENASDIAL YSGLGAAVVA VAVLVIGVTL
 351 YRRSQSDYGV DVIDSSALTG GFQTFNFKTV RQGNLLLLNS AMQPDLTVSR
 401 TYSGPICLQD PLDKELMTES SLFNPLSDIK VKVQSSFMVS LGVSERAHEYH
 451 GKNHSRTPFH GNNHSFSTMH PRNKMPYIQN LSSLPRTTEL RTTGVFGHLG
 501 GRLVMPNTGV SLLIPHGAIP EENSWEIYMS INQGEPSLQS DGSEVLLSPE
 551 VTCGPPDMIV TTPFALTIPH CADVSSEHWN IHLKKRTQQG KWEEVMSVED
 601 ESTSCYCLLD PFACHVLLDS FGTYALTGEP ITDCAVKQLK VAVFGCMSCN 50

651 SLDYNLRVYC VDNTPCAFQE VVSDE RHQGG QLLEPKLLH FKGNTFSLQI
 701 SVLDIPPFLW RIKPFTACQE VPFSRVWCSN RQPLHCAFSL ERYTPTTTQL
 751 SCKICIRQLK GHEQILQVQT SILESERETI TFFAQEDSTF PAQTGPKAFK
 801 IPYSIRQRIC ATFDPNAKG KDWQMLAQKN SINRNLSYFA TQSSPSAVIL
 851 NLWEARHQHD GDLDSLACAL EEIGRTHTKL SNISESQ

配列番号 : 33 (INSP017 全長ヌクレオチド配列)

1 ATGATCTTTA AGAATGGCCT TTCGAGGGTA CAAGATGCCA CTCCTCCTTG
 51 TCCTCTCCAC TGTGCTCAGC AATCACACCC TCCTGCCTTT GATTTTGTGG 10
 101 CAGTTTCCTG GGACTTAAGT CTTTGCTCAC TGTATGAAGA AACAGGAACT
 151 GACAATGGCG AAGCCCTTCC CGAATCCATC CCATCAGCTC CTGGGACACT
 201 GCCTCATTTT ATAGAGGAGC CAGATGATGC TTATATTATC AAGAGCAACC
 251 CTATTGCACT CAGGTGCAAA GCGAGGCCAG CCATGCAGAT ATTCTTCAAA
 301 TGCAACGGCG AGTGGGTCCA TCAGAACGAG CACGTCTCTG AAGAGACTCT 20
 351 GGACGAGAGC TCAGGTTTGA AGGTCCGCGA AGTGTTTCATC AATGTTACTA
 401 GGCAACAGGT GGAGGACTTC CATGGGCCCG AGGACTATTG GTGCCAGTGT
 451 GTGGCGTGGA GCCACCTGGG TACCTCCAAG AGCAGGAAGG CCTCTGTGCG
 501 CATAGCCTAT TTACGGAAAA ACTTTGAACA AGACCCACAA GGAAGGGAAG
 551 TTCCCATTGA AGGCATGATT GTA CTGCACT GCCGCCACC AGAGGGAGTC 30
 601 CCTGCTGCCG AGGTGGAATG GCTGAAAAAT GAAGAGCCCA TTGACTCTGA
 651 ACAAGACGAG AACATTGACA CCAGGGCTGA CCATAACCTG ATCATCAGGC
 701 AGGCACGGCT CTCGGACTCA GGA AATTACA CCTGCATGGC AGCCAACATC
 751 GTGGCTAAGA GGAGAAGCCT GTCGGCCACT GTTGTGGTCT ACGTGAATGG
 801 AGGCTGGTCT TCCTGGACAG AGTGGTCAGC CTGCAATGTT CGCTGTGGTA 40
 851 GAGGATGGCA GAAACGTTCC CGGACCTGCA CCAACCCAGC TCCTCTCAAT
 901 GGTGGGGCCT TTTGTGAGGG AATGTCAGTG CAGAAAATAA CCTGCACTTC
 951 TCTTTGTCCT GTGGATGGGA GCTGGGAAGT GTGGAGCGAA TGGTCCGTCT
 1001 GCAGTCCAGA GTGTGAACAT TTGCGGATCC GGGAGTGCAC AGCACCACCC
 1051 CCGAGAAATG GGGGCAAATT CTGTGAAGGT CTAAGCCAGG AATCTGAAAA 50

1101 CTGCACAGAT GGTCTTTGCA TCCTAGGCAT TGAGAATGCC AGCGACATTG
1151 CTTTGTACTC GGGCTTGGGT GCTGCCGTCG TGGCCGTTGC AGTCCTGGTC
1201 ATTGGTGTCA CCCTTTACAG ACGGAGCCAG AGTGACTATG GCGTGGACGT
1251 CATTGACTCT TCTGCATTGA CAGGTGGCTT CCAGACCTTC AACTTCAAAA
1301 CAGTCCGTCA AGGTA ACTCC CTGCTCCTGA ATTCTGCCAT GCAGCCAGAT 10
1351 CTGACAGTGA GCCGGACATA CAGCGGACCC ATCTGTCTGC AGGACCCTCT
1401 GGACAAGGAG CTCATGACAG AGTCCTCACT CTTTAACCCT TTGTCCGACA
1451 TCAAAGTGAA AGTCCAGAGC TCGTTCATGG TTTCCCTGGG AGTGTCTGAG
1501 AGAGCTGAGT ACCACGGCAA GAATCATTCC AGGACTTTTC CCCATGGAAA
1551 CAACCACAGC TTTAGTACAA TGCATCCCAG AAATAAAATG CCCTACATCC 20
1601 AAAATCTGTC ATCACTCCCC ACAAGGACAG AACTGAGGAC AACTGGTGTC
1651 TTTGGCCATT TAGGGGGGCG CTTAGTAATG CCAAATACAG GGGTGAGCTT
1701 ACTCATACCA CACGGTGCCA TCCCAGAGGA GAATTCTTGG GAGATTTATA
1751 TGTCCATCAA CCAAGGTGAA CCCAGCCTCC AGTCAGATGG CTCTGAGGTG
1801 CTCCTGAGTC CTGAAGTCAC CTGTGGTCCT CCAGACATGA TCGTCACCAC 30
1851 TCCCTTTGCA TTGACCATCC CGCACTGTGC AGATGTCAGT TCTGAGCATT
1901 GGAATATCCA TTTAAAGAAG AGGACACAGC AGGGCAAATG GGAGGAAGTG
1951 ATGTCAGTGG AAGATGAATC TACATCCTGT TACTGCCTTT TGGACCCCTT
2001 TGCCTGTCAT GTGCTCCTGG ACAGCTTTGG GACCTATGCG CTCACTGGAG
2051 AGCCAATCAC AGACTGTGCC GTGAAGCAAC TGAAGGTGGC GGTTTTTGGC 40
2101 TGCATGTCCT GTA ACTCCCT GGATTACAAC TTGAGAGTTT ACTGTGTGGA
2151 CAATACCCCT TGTGCATTTT AGGAAGTGGT TTCAGATGAA AGGCATCAAG
2201 GTGGACAGCT CCTGGAAGAA CCAA AATTGC TGCATTTCAA AGGGAATACC
2251 TTTAGTCTTC AGATTTCTGT CTTGATATT CCCCCATTCC TCTGGAGAAT
2301 TAAACCATTCT ACTGCCTGCC AGGAAGTCCC GTTCTCCCGC GTGTGGTGCA 50

2351 GTAACCGGCA GCCCCTGCAC TGTGCCTTCT CCCTGGAGCG TTATACGCC
 2401 ACTACCACCC AGCTGTCCTG CAAAATCTGC ATTCGGCAGC TCAAAGGCCA
 2451 TGAACAGATC CTCCAAGTGC AGACATCAAT CCTAGAGAGT GAACGAGAAA
 2501 CCATCACTTT CTTCGCACAA GAGGACAGCA CTTTCCCTGC ACAGACTGGC
 2551 CCCAAAGCCT TCAAATTC CTACTCCATC AGACAGCGGA TTTGTGCTAC
 2601 ATTTGATACC CCCAATGCCA AAGGCAAGGA CTGGCAGATG TTAGCACAGA
 2651 AAAACAGCAT CAACAGGAAT TTATCTTATT TCGCTACACA AAGTAGCCCA
 2701 TCTGCTGTCA TTTTGAACCT GTGGGAAGCT CGTCATCAGC ATGATGGTGA
 2751 TCTTGACTCC CTGGCCTGTG CCCTTGAAGA GATTGGGAGG ACACACACGA
 2801 AACTCTCAAA CATTTCAGAA TCCCAGCTTG ATGAAGCCGA CTTCAACTAC
 2851 AGCAGGCAAA ATGGACTC

10

20

配列番号 : 34 (INSP017全長ポリペプチド配列)

1 MIFKNGLSRV QDATPPCPLH CAQQSHPPAF DFVAVSWDLS LCSLYEETGT
 51 DNGEALPESI PSAPGTLPHF IEEPDDAYII KSNPIALRCK ARPAMQIFFK
 101 CNGEWWHQNE HVSEETLDES SGLKVRETFI NVTRQQVEDF HGPEDYWCQC
 151 VAWSHLGTSK SRKASVRIAY LRKNFEQDPQ GREVPIEGMI VLHCRPPEGV
 201 PAAEVEWLKN EEPIDSEQDE NIDTRADHNL IIRQARLSDS GNYTCMAANI
 251 VAKRRSLSAT VVVYVNGGWS SWTEWSACNV RCGRGWQKRS RTCTNPAPLN
 301 GGAFCEGMSV QKITCTSLCP VDGSWEVWSE WSVCSPECEH LRIRECTAPP
 351 PRNGGKFCEG LSQESENCTD GLCILGIENA SDIALYSLG AAVVAVAVLV
 401 IGVTLYRRSQ SDYGVDVIDS SALTGGFQTF NFKTVRQGNS LLLNSAMQPD
 451 LTVSRTYSGP ICLQDPLDKE LMTESLFPN LSDIKVKVQS SFMVSLGVSE
 501 RAEYHGKNHS RTFPHGNNHS FSTMHPRNKM PYIQNLSSLP TRTELRTTG
 551 FGHLGGRLVM PNTGVSLIP HGAIPEENSW EIYMSINQGE PSLQSDGSEV
 601 LLSPEVTCGP PDMIVTTPFA LTIPHCADVS SEHWNIHLKK RTQQGKWEV

30

40

50

651 MSVEDESTSC YCLLDPFACH VLLDSFGTYA LTGEPITDCA VKQLKVAVFG
 701 CMSCNSLDYN LRVYCVDNTP CAFQEVSDE RHQGGQLEE PKLLHFKGNT
 751 FSLQISVLDI PPFLWRIKPF TACQEVPPFSR VWCSNRQPLH CAFSLERYTP
 801 TTTQLSCKIC IRQLKGHEQI LQVQTSILES ERETITFFAQ EDSTFPAQTG
 851 PKAFKIPYSI RQRICATFDT PNAKGKDWQM LAQKNSINRN LSYFATQSSP
 901 SAVILNLWEA RHQHDGDLDS LACALEEIGR THTKLSNISE SQLDEADFNY

10

951 SRQNGL

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】 INSP017のポリペプチド配列（最初の推定、すなわち配列番号：32）を示す。

【図2】 検索物として INSP017（配列番号：32）を用いる NCBI-nr での上位10個の BLAST ヒットを示す。

【図3】 上位 BLAST ヒットと INSP017（配列番号：32）のポリペプチド配列とのアラインメントを示す。

20

【図4】 INSP017の推定ヌクレオチド配列をその翻訳とともに示す。

【図5】 RACE PCRにより同定した INSP017全長cDNAを示す。シェード部分の配列は INSP017（配列番号：34）の最初の推定を示す。

【図6】 PCR4-TOPO-INST017のマップを示す。

【図7】 推定（配列番号：32）及びクローン（配列番号：34）配列を示す。クローン配列におけるシェード部分の配列は、最初の INSP017推定にはない配列を示す。

【図8】 BLAST検索により配列比較した推定（配列番号：32）及びクローン（配列番号：34） INSP017配列を示す。

【図9】 NCBI-nrに対するクローン INSP017配列（配列番号：34）の Tblastnを示す。

【図10】 推定を支持する ESTを示す。NCBI-setに対するクローン INSP017配列（配列番号：34）の Tblastnを示す。

30

Figure 4

```

1  CTCTCCGAT  CCATCCGAC  AGCCCGGAG  AGATGCGTC  ATTTCATGA  GGACACGAT
   1 p e a i p x a a p g e t r n i i e e r p d
61  GATGCTTATA  TATACAGAG  CAGCCATAT  GCACTCACT  CCGAAGGAG  GCGACCGAG
   d a y i i x l k r o a i r c k a k r a n
121  GATATATCT  TGAATGCGA  CCGGAGTCC  CTGCATGGA  ATGAGAGCC  CCGCAGAGG
   q i f l k e o n g u e t c t o a n g a g g
181  ACTCTGAGC  AATGTCGAG  TGTGAGTCC  CTGCATGAT  TATCAATCT  TACTAGCGA
   t l d e a s e l l x v r e v i i n v l r g
241  CAGTCGAGC  ACTTCGATG  GCGCGAGAG  TATTCGCGC  AATGTCGAG  CTGAGCGAC
   q v e d i i g r e d y m c q c v a w a h
   CPT
261  CTCTGACTC  CCGAAGGAG  GAGCCCTCT  CCGCCGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   l g t s k a y k a a v z i a y i i x k r e
361  GAGCAGAGC  CAGAGGAG  GGAATGCTC  ATTGAGGCA  TGATGCTCT  GCACTGCGC
   e a u p e q e e r p i e g x i v i h e k
421  CCGAGGAGC  GATCTCTCC  TCGGAGTCC  GATTCGCGC  AATATGAGA  GCGATGAG
   p r e g y a a a y e w i i x e e r p i d
481  TGTGAGGAG  AGCAGAGAT  TGTGAGGAG  GCGTCAATTA  ACTGATGAT  GAGCGAGCA
   a e g e a g t a g t a g n i i a e g a
   63765 G14415
511  GCGCTCTCG  ACTGAGAAA  TTACAGTCC  ATGGCAGCCA  ACATGCTCC  TTAGAGAGA
   n y e c n a a n i v a k k z k
   63775 G14415
601  AGCTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   s i e a i y y v y v p g g e s e e e w
   63785 G14415
661  TCGAGTCCA  ATGCGCGCT  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   a u n u e e e e e e e e e e e e e e e e
   63795 G14415
721  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   p a p l e g s n i c e e e e e e e e e e
   63805 G14415
761  ACTCTCTCT  CTCTCTGGA  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   t a i c r y d g a y e e e e e e e e e e
81  GCGAGTCTG  AACTCTGCG  GATCTCTGCG  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   p e e h l i i z e e c t a p p r y n g g
91  AATCTCTG  AAGCTCTAG  CCGAGTCTG  GAGTCTGCG  CAGTCTGCT  TGTGATCTA
   k f c e g l a g e s e a c c g g l c a l
96  GCGTCTGAG  ATGCGCGCT  GATCTCTGCG  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   g i c n a a d i a l y a g i g a a a v v c
102  GGTGAGTCT  TGTGAGTCT  TGTGAGTCT  TGTGAGTCT  TGTGAGTCT  TGTGAGTCT
   v a v l v i e v t l y r r a g s d y g v

```

```

1681  GAGTCTGAG  ATCTCTGCG  ATGCGAGCT  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   d v i j e a a l l u g g f g t f n z k e v
1144  CTGCATGAT  ATCTCTGCG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   t g g n o z i l n h a e q p d l e v e e
1101  AATGAGGAG  GAGTCTGCG  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   t y o y p e c i g q e p l d a e i e o k k
1261  TGTGATCTA  AACTCTGCG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   e l f a p n d i k k v x v q s a z a v n
1321  CTGCATGAT  CTGCATGAG  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   l g v a e r a e y h g k n h s k t e r p
1381  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   s r n h a i a t o h p r n k e r y o g n
1441  CTGCATGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   l e a l p e r t c e l t f e g v l i g h i g
1501  GCGTCTGAG  TGTGAGGAG  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  TGTGAGGAG  TGTGAGGAG
   z e l y e p n e g v a e l i p r h y a k p
1561  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   e o o n n o y x o i n g g o p e l g s
1621  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   d g s e v l l a p e v l c g p p d h i v
1681  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   l p e a l i p e c a d v s e v h w n
1741  ATCTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   i h i k x x l q q g k w e r v e e e d
1801  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   e a t r e y e l i e p t a e h v l i d s
1861  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   l g v a l i e g e p i e d e a v x q i k
1921  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   v a v i g e a e e p a i d y n i r v y e
1981  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   v a n e p a a r f g g v v s l e x h g g
2041  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   g l e e p k l i e f x g n e c t s l i g
2101  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   a v l d i p e l l x k k k p l l a e q l
2161  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
   v p f a e y w e a n a p r i v a e l s i

```

【 図 4 】
Figure 4(続き)

```

2221  GAGCGTTATA  GCGCCACTG  CACCCAGCTG  TCTGCAAAA  TGTGATTGG  GCAGCTCAA
   e r y t p i t t a l s c k i c i r d k
2281  GGCCATGAAC  AGATCCTCCA  AGTCGAGACA  TCAATCCTAG  AGAGTGAACG  AGAAACCATC
   h e q i l q v t s i l e s e r e t i
2341  ACTTTCTTGG  CACAAGAGGA  CAGCACATTG  CCTGCGACAGA  CTGCGCCCCAA  AGCCTTCAAA
   t f f a g e d e l f p a d t g p k a f k
2401  ATTCCCTACT  CCATCAGACA  GCGGATTITG  GCTACATTGG  ATAOCCECAA  TGCCAAAGGC
   l p y s i r q r i c a t f d t p n a k g
2461  AAGGACTGGC  AGATGTTAGC  ACAGAAAAAC  AGCATCAACA  GGAATTTATC  TTATTTGCT
   x d w q m l a q k n s i n r n i s y f a
2521  ACACAAAGTA  GCCCATCTGC  TGTCTATTTG  AACCTGTGGG  AAGCTCGTCA  TCAGCATGAT
   l q s s p s a v i l n i w e a r h q h d
2581  GGTGATCTTG  ACTCCCTGGC  CTGTGCCCTT  GAAGGATTTG  GGAGGACACA  CACGAAACTC
   g d l d s l a c a l e e i g r t h t k l
2641  TCAAACATTT  CAGAATCCCA  G
   s n i e e a q

```

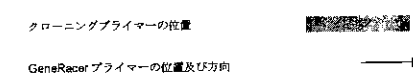
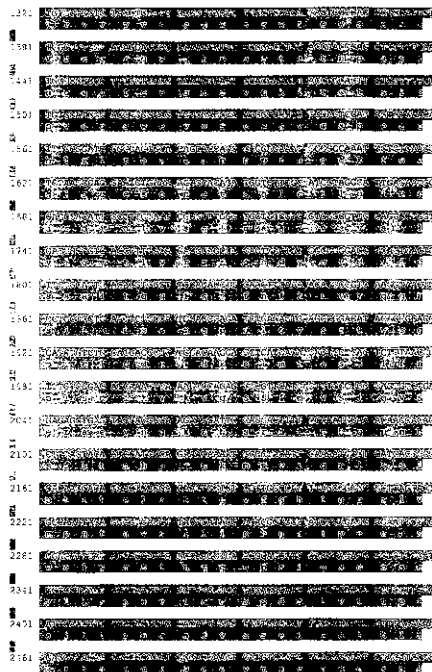


Figure 5

```

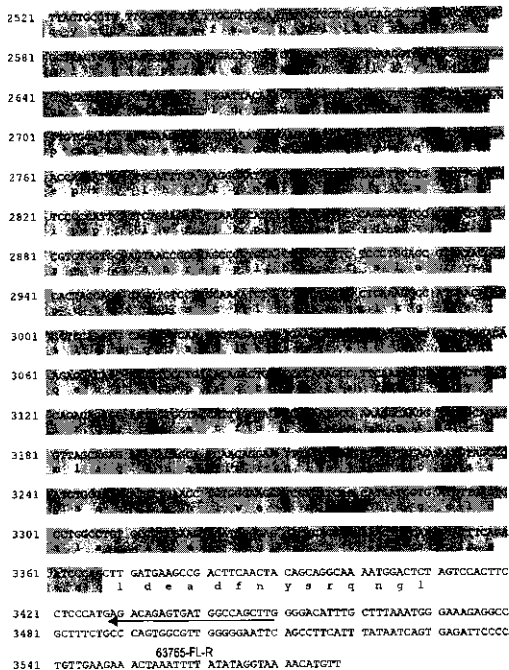
1  CTCTCTGAG  ATCTCTGCG  ATGCGAGCT  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
61  TGTGAGTCT  CCATCTTCA  ACTGAGGCT  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
122  GATCTCTG  AATGTCGAG  CCGGAGTCC  CTGCATGGA  ATGAGAGCC  CCGCAGAGG
181  ACTCTGAGC  AATGTCGAG  TGTGAGTCT  CTGCATGAT  TATCAATCT  TACTAGCGA
241  CAGTCGAGC  ACTTCGATG  GCGCGAGAG  TATTCGCGC  AATGTCGAG  CTGAGCGAC
291  AATGAGGAG  GAGTCTGCG  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
361  AATCTCTGAA  GAGGAGGGA  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
421  GATCTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
481  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
541  AATGATCTT  AAGATGCGC  TGTGAGGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
601  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
661  TGTGATCTA  AACTCTGCG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
721  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
781  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
841  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
901  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
961  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
1021  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
1081  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
1141  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
1201  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG
1261  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG  GCGTCTGAG

```



【 図 5 】

Figure 5(続き)



最初の推定の範囲を示す。

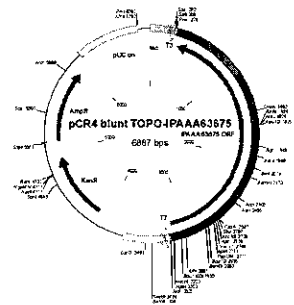
【 図 6 】

Figure 6

分子: PCR4 blunt TOPO-INSP017, 6887 bps DNA 環状
 ファイル名: V11G8BEC.cm5,
 説明: plasmid ID 13287

分子の特徴:

型	開始	終点	名称	説明
領域	2	216	lac	プロモーター領域
領域	205	221		M13 リバースプライミング部位
領域	217	294		LacZa-codB 遺伝子融合*
マーカー	243		T3	
領域	262	294		ポリリンカー
領域	294	294		TOPO クローニング部位
遺伝子	3199	331 C	INSP017 ORF	
領域	3224	295 C		クローニング PCR 産物
領域	3225	3740		*LacZa-codB 遺伝子融合
領域	3225	3242		*ポリリンカー
領域	3225	3225		*TOPO クローニング部位
マーカー	3277		C T7	
領域	3300	3285 C		-20M13 フォワードプライミング部位
遺伝子	4089	4883	KanR	
領域	5075	5079		リボソーム結合部位
遺伝子	5087	5947	AmpR	
領域	6092	6765	pUC ori	



PCR4-TOPO INSP017

```

1  AGCGCCGAT  AGGAAACAG  GTCACCCCG  GAGTTCGCG  GATGATGAA  TCGACATCG
61  AGCGACGDT  TCGCACTCG  AAAGCGGCA  GCGACGGAA  GCGATTATY  GTGACTTAC
121  TCACTATTA  TSKACGQDA  GGTTCAGAA  TGTGKTCDC  GCGTGLATG  TGTGKQAAA
181  TTGTGAGUS  APACAAATY  GAGAKWAAA  AGACGLATA  GATATATAT  GCGAGCTCA
241  MANTAAAGC  TCAATAAAG  GACAGGCGC  GAGATLAAA  AGAATLGGC  GCTGCGGAC
301  ATACATCTY  CPTALGGAG  GAAGTGGAT  ATACTGATY  TCGTGTGTC  TACTTGAAT
361  GCGCTTATC  AGAGGAGAT  TGTAAATG  TTGAGACTY  CRTSTATTC  GTCGCAACT
421  CTTGAGGCG  AAAGCGCAC  GASTGAGAT  GACGACATG  CFTATAGAA  GCTTCGACA
481  GGTTCAGAT  TACAGAGAT  GCGCTATTC  GTTAAAGAA  ATAGATATA  TTGCTGTGA
541  TCGTCTTTC  CCGTGTAA  ATGCGGAT  GCGTCTGTC  GCGTTCGAG  GTAGGATTC
601  TACGACAT  CCGTCTGTC  ATGAGTAA  TAACTTAAA  GAGTCTGTA  GAGTCTGTC
661  GAGGAGAT  TGTGKTCY  TGTGQAAA  AGGATGAG  TGTCTGTA  GCTTCAGAA
721  CTTGACTTC  GAGTGGAG  AGCTGTA  GCGTCTGAG  GCTGCAATG  GATATCTTC
781  AGAGAGCT  GGTGTATG  GCGTATA  GCGTCTGTA  TAAAGTAA  TTAGGATTC
841  GCGTCTAT  GCGTCTGTC  GCGTAAAG  GCGTCTGTC  GAGGATG  TATGATLTA
901  TTTGAGAG  TATGATGAA  ATATAGAA  TAAAGTAA  AGGATGAG  GATATCTTC
961  TAAATGAG  GATATCTTC  TGTTCAGAA  GGTTCGACA  TTTGCTTC  TCAATGAAA
1021  GAGTCTGTC  TATGATGAA  GCGTCTGTC  GCGTCTGTA  AGCTGTA  TTAGGATTC
1081  GCGTCTAT  TATGATGAA  TAAAGTAA  GCGTCTGTC  TGTTCAGAA  TTAGGATTC
1141  TGTTCAGAA  TTAGGATTC  TATGATGAA  TAAAGTAA  AGGATGAG  GATATCTTC
1201  AGGATGAG  GATATCTTC  TGTTCAGAA  GGTTCGACA  TTTGCTTC  TCAATGAAA
1261  ATTTGAGAG  GGTTCGACA  TTTGATGAA  GAGTCTGTA  ATGATGAA  TTAGGATTC
1321  TAAATGAG  TTAGGATTC  TATGATGAA  TAAAGTAA  AGGATGAG  GATATCTTC
1381  TGTTCAGAA  TTAGGATTC  TATGATGAA  TAAAGTAA  AGGATGAG  GATATCTTC
1441  TGTTCAGAA  TTAGGATTC  TATGATGAA  TAAAGTAA  AGGATGAG  GATATCTTC
1501  AGGATGAG  GATATCTTC  TGTTCAGAA  GGTTCGACA  TTTGCTTC  TCAATGAAA
1561  TGTTCAGAA  TTAGGATTC  TATGATGAA  TAAAGTAA  AGGATGAG  GATATCTTC

```


【 8 】

Figure 8.

Query: Cloned sequence 1850 ID NO: 24)
 4956 letters
 Database: predict_pp 156Q ID NO: 321
 3 sequences: 187 total letters
 Source:aa1.dna

Score E
 Sequences producing significant alignments:
 Value (bits)

Predicted-IM3P017 454E 0.0

>Predicted-IM3P017
 Length = 857

Score 1838 bits (4751), Expect = 4.0
 Identifiers = 547/551 (100%), Positives = 45/46E (100%)

Query: 55 LEESLPSMPTMPLPFLPFGDAVITKSNPTALRCKRFAKQTFPFCNKNVWVQKRFVSR 114
 LPSLPSMPTMPLPFLPFGDAVITKSNPTALRCKRFAKQTFPFCNKNVWVQKRFVSR 114
 Subject: 1 LEESLPSMPTMPLPFLPFGDAVITKSNPTALRCKRFAKQTFPFCNKNVWVQKRFVSR 109

Query: 116 QLSRSGLKRVKRVVTVYKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 175
 QLSRSGLKRVKRVVTVYKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 175
 Subject: 41 QLSRSGLKRVKRVVTVYKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 120

Query: 176 EQDQREVPVQV 235
 EQDQREVPVQV 235
 Subject: 127 EQDQREVPVQV 180

Query: 236 RLKSNKTCMAKIVYARRKLSATVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY 250
 RLKSNKTCMAKIVYARRKLSATVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY 250
 Subject: 131 RLKSNKTCMAKIVYARRKLSATVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY 240

Query: 256 PAPLNQARPCDQV 255
 PAPLNQARPCDQV 255
 Subject: 211 PAPLNQARPCDQV 330

Query: 316 RECEGLSSSRKCTDGLLGLIENASDIALYSGLKAVAVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 419
 RECEGLSSSRKCTDGLLGLIENASDIALYSGLKAVAVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 419
 Subject: 501 RECEGLSSSRKCTDGLLGLIENASDIALYSGLKAVAVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 360

Query: 416 LVLSKALDGGDCTREFFVYKARDLAKMANKOQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 475
 LVLSKALDGGDCTREFFVYKARDLAKMANKOQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 475
 Subject: 547 LVLSKALDGGDCTREFFVYKARDLAKMANKOQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 430

Query: 476 SEFQKQKLVQV 535
 SEFQKQKLVQV 535
 Subject: 421 SEFQKQKLVQV 490

Query: 536 LKSLPQKELKQV 595
 LKSLPQKELKQV 595
 Subject: 451 LKSLPQKELKQV 540

Query: 596 LKSLPQKELKQV 655
 LKSLPQKELKQV 655
 Subject: 511 LKSLPQKELKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 630

Query: 656 LKSLPQKELKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 715
 LKSLPQKELKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 715
 Subject: 661 LKSLPQKELKQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 690

Query: 716 VQV 775
 VQV 775
 Subject: 671 VQV 740

Query: 776 VQV 835
 VQV 835
 Subject: 681 VQV 800

Query: 836 VQV 895
 VQV 895
 Subject: 731 VQV 840

Query: 896 VQV 955
 VQV 955
 Subject: 781 VQV 930

Query: 956 VQV 1015
 VQV 1015
 Subject: 841 VQV 990

【 9 】

Figure 9.

Query: cloned protein 1852 ID NO:24)
 4956 letters
 Database: All non-redundant Genbank CDS
 translations+PDB+SwissProt+TrEMBL
 1,747,746 sequences, 565,571,175 total letters
 Source:leg.....aa1.dna

Score E
 Sequences producing significant alignments:
 Value (bits)

ref189_543146.1 unc-5 homolog C; KIAA1777 protein [Homo sapiens] 1670 0.0
 ref189_694775.11 unc-5 homolog C; elegans 4; netrin receptor [Caenorhabditis elegans] 1628 0.0
 ref189_146766.71 similar to netrin receptor [Drosophila melanogaster] 1625 0.0
 ref189_783465.1 transmembrane receptor [Drosophila melanogaster] 1496 0.0
 gbl1A034486.14 UNC-5 receptor [Xenopus laevis] 905 0.0
 emb1D0332281.11 netrin receptor [Drosophila melanogaster] 872 0.0
 ref189_771542.11 transmembrane receptor [Drosophila melanogaster] 874 0.0
 ref189_184246.11 unc-5 homolog C; elegans 2 [Mus musculus] 861 0.0
 ref189_103458.11 UNC-5 homolog C; elegans 3 [Mus musculus] 841 0.0
 ref189_190959.11 similar to UNC-5 homolog C; elegans 3 [Mus musculus] 840 0.0
 ref189_1021719.21 unc-5 homolog C; homolog of C. elegans transmembrane receptor [Drosophila melanogaster] 839 0.0
 ref189_694775.11 transmembrane receptor [Drosophila melanogaster] 837 0.0
 ref189_771542.11 transmembrane receptor [Drosophila melanogaster] 837 0.0
 ref189_694775.11 unc-5 homolog C; elegans 1; netrin receptor [Caenorhabditis elegans] 836 0.0
 ref189_138463.21 similar to netrin receptor [Drosophila melanogaster] 792 0.0
 ref189_543146.11 unc-5 homolog C; KIAA1777 protein [Homo sapiens] 1670 0.0
 ref189_694775.11 KIAA1777 protein [Homo sapiens] 1670 0.0
 Length = 518
 Score = 1845 bits (4845), Expect = 0.0

Identifiers = 607/516 (98%), Positives = 507/519 (98%), Gaps = 11/519 (2%)

Query: 49 GTDNGALPSTFSAPQTLZHFLEEDQNTIIVASNEIAGHIAHMQVIFKNGEKVHD 109
 GTDNGALPSTFSAPQTLZHFLEEDQNTIIVASNEIAGHIAHMQVIFKNGEKVHD 109
 Subject: 30 GTDNGALPSTFSAPQTLZHFLEEDQNTIIVASNEIAGHIAHMQVIFKNGEKVHD 89

Query: 109 NEWSEELTDLQGLVQRVTVVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY 169
 NEWSEELTDLQGLVQRVTVVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY 169
 Subject: 90 NEWSEELTDLQGLVQRVTVVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVY 149

Query: 169 AVLRNTEGQDQV 228
 AVLRNTEGQDQV 228
 Subject: 153 AVLRNTEGQDQV 209

Query: 229 NLLEPQARPCDQV 288
 NLLEPQARPCDQV 288
 Subject: 219 NLLEPQARPCDQV 269

Query: 289 BSRCQVHPLNGEVECESEVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 348
 BSRCQVHPLNGEVECESEVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 348
 Subject: 270 BSRCQVHPLNGEVECESEVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV 329

Query: 349 PPRNPKPQV 408
 PPRNPKPQV 408
 Subject: 330 PPRNPKPQV 389

Query: 409 VLVQVTVVRRSDQV 468
 VLVQVTVVRRSDQV 468
 Subject: 350 VLVQVTVVRRSDQV 417

【配列表】

2005532035000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB 02/05856
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 G01N33/50	C07K14/705 G01N33/53
	C12N5/10 A61K38/17	C07K16/00 A61K39/00
	C12Q1/68 A01K67/027	
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 A61K A01K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ACKERMAN, S.L. ET AL.: "The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein" NATURE, vol. 386, no. 6627, 24 April 1997 (1997-04-24), pages 838-842, XP001093890 the whole document see especially: abstract and page 841; figure 4	1-6, 8-14, 18-42
	--- -/--	
<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	Date of mailing of the international search report	
4 July 2003	18. 08. 2003	
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer	
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) 340-2016	Fuchs, U	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/05856

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 02 079448 A (INCYTE GENOMICS, INC.) 10 October 2002 (2002-10-10)	1,2,4-6, 8-14, 18-42
P,A	abstract page 6, line 1 - line 8 receptor: GCREC-63 page 7, line 7 -page 12, line 18 page 28, line 8 -page 68, line 8 SEQ ID NOS: 63 and 136 page 92; table 1 page 98; table 2 page 158 -page 159; table 3 page 170; table 4 page 171; table 5 page 172; table 6 page 179 -page 196; claims 1-55,118,191 page 258 -page 260 page 306 -page 307 ---	3
P,X	DATABASE WPI Week 200259 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2002-552746 XP002246575 -& JP 2002 153290 A (KAZUSA DNA KENKYUSHO) , 28 May 2002 (2002-05-28) cited in the application	1,2,4-6, 8-14, 18-42
P,A	SEQ ID NOS: 1 and 2 page 10 -page 22	3
P,X	WO 02 079398 A (CURAGEN CORPORATION) 10 October 2002 (2002-10-10)	1,2,4-6, 8-14, 18-42
P,A	abstract NOVX clone: 23a page 8, line 17 -page 85, line 2 page 158 -page 162; example 23 page 314, line 7 -page 322, line 4 SEQ ID NOS: 115 and 116 page 404 -page 410; claims 1,2,5-21,23-32 -----	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/05856

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

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: 7, 15-17
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/GB 02/05856

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 32-34 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 19 (as far as in vivo methods are concerned), 24-26 and 35 (as far as in vivo methods are concerned) are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 7, 15-17

Present claims 1(ii) and 7 and dependent claims 2-6, 8-14 and 18-42 relate to a fragment of a polypeptide comprising the amino acid sequence as recited in SEQ ID NO: 34 or SEQ ID NO: 32 "having an antigenic determinant in common with the polypeptide of claim 1(i)".

The claims cover all fragments having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and no disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such fragments. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the fragment by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of claim 1(ii) and dependent claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to a fragment of a polypeptide comprising the amino acid sequence as recited in SEQ ID NO: 34 or SEQ ID NO: 32 having transmembrane protein function, particularly netrin receptor activity, as mentioned in the description, on page 12, lines 24-27. No search has been carried out for the subject-matter of claim 7.

Furthermore, present claims 13 and 14 and dependent claims 18, 21, 27, 29, 31 and 32-34 relate to a ligand defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "... which binds specifically to, and which preferably stimulates the activity of, a polypeptide according to any one of claims 1-7".

The claims cover all ligands having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such ligands. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the ligand by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope

International Application No. PCT/GB 02/05856

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of claims 13, 14 and dependent claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to a ligand which binds specifically to a polypeptide according to any one of claims 1-7, which is an antibody as mentioned in the description, on page 13, lines 13-19.

Moreover, present claims 15-17 and dependent claims 18, 29, 31 and 32-34 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "... that either increases or decreases the level of expression or activity of a polypeptide according to any one of claims 1-7", "... that binds to a polypeptide according to any one of claims 1-7 without inducing any of the biological effects of the polypeptide" and "... which is a natural or modified substrate, ligand, enzyme, receptor or structural or functional mimetic".

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and no disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search impossible. Consequently, no search has been carried out for the subject-matter of claims 15-17 and the corresponding parts of dependent claims 18, 29, 31 and 32-34.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/05856

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02079448 A	10-10-2002	WO 02079448 A2	10-10-2002
JP 2002153290 A	28-05-2002	NONE	
WO 02079398 A	10-10-2002	WO 02079398 A2	10-10-2002
		WO 02072757 A2	19-09-2002
		WO 02072771 A2	19-09-2002
		WO 02072770 A2	19-09-2002
		WO 02070660 A2	12-09-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/43	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 9/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 15/08	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 37/02	C 0 7 K 14/705	
A 6 1 P 43/00	C 1 2 M 1/00	A
C 0 7 K 14/705	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 M 1/00	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	F
	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 37/48	

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

(72) 発明者 フィッツジェラルド スティーブン ノエル
イギリス ロンドン ダブリュ1ティー 2 エヌユー チャーロット ストリート 60 インフ
ァーマティカ

(72) 発明者 ファガン リチャード ジョセフ

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

(72)発明者 フェルプス クリストファー ベンジャミン

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

(72)発明者 パワー クリスチン

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

(72)発明者 ヨルク メラニー

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

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36
DA37 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA05 CA09 CA11 DA06 EA03 HA14
HA17 HA19
4B029 AA07 FA12
4B063 QA06 QA08 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ43 QQ52 QQ79 QR32
QR35 QR48 QR55 QR62 QR77 QS25 QS34
4B065 AA26X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 DC01 DC50
NA14 ZA012 ZA121 ZA122 ZA161 ZA162 ZA182 ZA361 ZA362 ZA451
ZA452 ZA811 ZA812 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB261 ZB262 ZB271
ZB272 ZB321 ZB322 ZC022 ZC351 ZC352 ZC551 ZC552
4C085 AA03 BB11 BB23
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA12 ZA16 ZA18
ZA36 ZA45 ZA81 ZA96 ZB07 ZB26 ZB27 ZB32 ZC02 ZC35
ZC55
4C087 AA01 AA02 BB63 BB65 CA04 CA12 NA14 ZA12 ZA16 ZA18
ZA36 ZA45 ZA81 ZA96 ZB07 ZB26 ZB27 ZB32 ZC02 ZC35
ZC55
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	跨膜蛋白		
公开(公告)号	JP2005532035A	公开(公告)日	2005-10-27
申请号	JP2003556445	申请日	2002-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	Inpharmatica公司有限公司		
申请(专利权)人(译)	Inpharmatica公司有限公司		
[标]发明人	フィッツジェラルド スティーブン ノエル ファガン リチャード ジョセフ フェルプス クリストファー ベンジャミン パワー クリスチン ヨルク メラニー		
发明人	フィッツジェラルド スティーブン ノエル ファガン リチャード ジョセフ フェルプス クリストファー ベンジャミン パワー クリスチン ヨルク メラニー		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K38/00 A61K38/43 A61K39/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P13/12 A61P15/08 A61P19/08 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P43 /00 C07K14/705 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1 /02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61K39/00 A61P13/12 A61P15/08 A61P19/08 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 C07K14 /705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K39/00.H A61K45/00 A61K48/00 A61P3 /10 A61P9/00 A61P9/10.101 A61P13/12 A61P15/08 A61P19/08 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P43 /00.111 C07K14/705 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15. Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N15/00.F A61K37/02 A61K37/48		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045 /DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024 /HA14 4B024/HA17 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA06 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063 /QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084 /AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC01 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA121 4C084/ZA122 4C084/ZA161 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA451 4C084/ZA452 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZB321 4C084/ZB322 4C084/ZC022 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4C084/ZC551 4C084/ZC552 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/BB23 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086 /EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA12 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA36 4C086/ZA45 4C086/ZA81 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB32 4C086 /ZC02 4C086/ZC35 4C086/ZC55 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/BB65 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA12 4C087/ZA16 4C087/ZA18 4C087/ZA36 4C087/ZA45 4C087		

/ZA81 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB32 4C087/ZC02 4C087/ZC35
 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045
 /EA50 4H045/FA74

代理人(译)	小川伸男
優先権	2001030721 2001-12-21 GB
其他公开文献	JP2005532035A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明基于以下发现：INSP017蛋白起跨膜蛋白分子的作用，优选作为 netrin 受体家族的跨膜蛋白分子的作用。

ライン シリー	組織 / 細胞源	ベクター	ホスト株	供給元	カタログ 番号
1	ヒト胎児脳	Zap 11	XL1-BlueMRF ⁺	St*	936206
2	ヒト脾臓	GT10	LE392	C1**	HL1098a
3	ヒト下垂体	GT10	LE392	C1	HL1097a
4	ヒト胎盤	GT11	LE392	C1	HL1075b
5	ヒト精巣	GT11	LE392	C1	HL1010b
6	ヒト胎盤	GT10	LE392	本施設内	
7	ヒト胎児脳	GT10	LE392	本施設内	
8	ヒト胎児脳	GT10	LE392	本施設内	
9	ヒト胎盤	GT10	LE392	C1	HL1034a
10	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	HL1065a
11	ヒト胎児肺	GT10	LE392	C1	HL1072a
12	ヒト胎児腎	GT10	LE392	C1	HL1071a
13	ヒト胎児肝	GT10	LE392	C1	HL1064a
14	ヒト骨髄	GT10	LE392	C1	HL1058a
15	ヒト末梢血単球	GT10	LE392	C1	HL1050a
16	ヒト胎盤	GT10	LE392	本施設内	
17	ヒトSHSY5Y	GT10	LE392	本施設内	
18	ヒトU373細胞株	GT10	LE392	本施設内	
19	ヒトCFPoc-1細胞株	Uni Zap	XL1-BlueMRF ⁺	St	936206
20	ヒト網膜	GT10	LE392	C1	HL1132a
21	ヒト膀胱	GT10	LE392	本施設内	
22	ヒト血小板	Uni Zap	XL1-BlueMRF ⁺	本施設内	
23	ヒト神経幹細胞Kan+Ts	GT10	LE392	本施設内	
24	ヒト気管平滑筋	GT10	LE392	本施設内	
25	ヒト気管平滑筋	GT10	LE392	本施設内	
26	ヒト胸腺	GT10	LE392	C1	HL1127a
27	ヒト脾臓Gストレッチ	GT11	LE392	C1	HL1134b
28	ヒト末梢血単球	GT10	LE392	C1	HL1050a
29	ヒト精巣	GT10	LE392	C1	HL1065a
30	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	HL1065a
31	ヒト胎盤	GT10	LE392	C1	HL1093a
32	ヒト胎盤#11	GT11	LE392	C1	HL1075b
33	ヒト胎児脳	GT10	LE392	C1	カスラム
34	ヒト胎盤#59	GT10	LE392	C1	HL5014a
35	ヒト下垂体	GT10	LE392	C1	HL1097a
36	ヒト膀胱#63	Uni ZapXR	XL1-BlueMRF ⁺	St	937208
37	ヒト胎盤#19	GT11	LE392	C1	HL1008
38	ヒト肝臓Gストレッチ	GT11	LE392	C1	HL1115b
39	ヒト子宮	Zap-CMVXR	XL1-BlueMRF ⁺	St	980207
40	ヒト腎臓ジエンサー cDNAライブラリー	Triplex2	XL1-Blue	C1	HL5507a