

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2003 - 523748**

(P2003 - 523748A)

(43)公表日 平成15年8月12日(2003.8.12)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 16/40	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/40		19/00	4 B 0 2 4
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 3
1/19		1/21	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 48数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 561750(P2001 - 561750)

(86)(22)出願日 平成13年2月20日(2001.2.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月20日(2002.8.20)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/01858

(87)国際公開番号 W001/062940

(87)国際公開日 平成13年8月30日(2001.8.30)

(31)優先権主張番号 00103655.7

(32)優先日 平成12年2月21日(2000.2.21)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

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

(72)発明者 クルクセン、 フランツ - ヴェルネル  
ドイツ連邦共和国 64367 ミュールタル  
バーンホフシュトラ  
ーセ 39

(74)代理人 弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ホスホジエステラーゼ7 b型

(57)【要約】

血小板由来成長因子Dポリペプチドおよびポリヌクレオチドならびに組換え法によりそのようなポリペプチドを産生する方法が開示される。また、診断アッセイにおいて血小板由来成長因子Dポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いる方法も開示される。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 (a) 配列番号1または3のいずれか1つの配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと；

(b) 配列番号2または4のポリペプチド配列に少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列を含むポリペプチドと；

(c) 配列番号2または4のポリペプチド配列に少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドと；

(d) 配列番号2または4のポリペプチド配列と；

(e) (a) から (d) のいずれか1つのポリペプチドの断片および変異体とからなる群の1つより選択されるポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2または4のポリペプチド配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2または4のポリペプチド配列である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 (a) 配列番号1または3のポリヌクレオチド配列に少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと；

(b) 配列番号1または3のポリヌクレオチドに少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドと；

(c) 配列番号2または4のポリペプチド配列に少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと；

(d) 配列番号2または4のポリペプチド配列に少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドと；

(e) 配列番号1または3の配列または少なくとも15ヌクレオチドを有するその断片を有する標識プローブにより、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でライブラリをスクリーニングすることによって得られる、少なくとも100ヌクレオチドのヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドと；

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

オチドと；

(g)(a)から(g)のいずれか1つの前記ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド配列と；

(h)(a)から(g)のいずれか1つ；および(a)から(g)のいずれか1つのポリヌクレオチドの変異体および断片であるか、またはポリヌクレオチドに、その全体の長さにわたり相補的であるポリヌクレオチドとからなる群より選択されるポリヌクレオチド。

【請求項5】 (a)配列番号1または3のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドと；

(b)配列番号1または3のポリヌクレオチドと；

(c)(c)配列番号2または4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと；

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

【請求項6】 発現ベクターが適合する宿主細胞中に存在するときに、請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドを産生することができるポリヌクレオチドを含む発現系。

【請求項7】 請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドを発現する、請求項6に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞またはその細胞膜。

【請求項8】 請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドを産生する方法であって、請求項7に記載の宿主細胞を、前記ポリペプチドの産生に十分な条件下で培養する段階と、ポリペプチドを培地から回収する段階とを含む方法。

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

【請求項10】 請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドに免疫特異的な抗体。

【請求項11】 請求項1～3のいずれかに記載のポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング法であって、

(a) 候補化合物のポリペプチド(またはポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合蛋白質への結合を、候補化合物に直接または間接的に結合した標識によって定量的または定性的に測定または検出すること;

(b) 標識競合物質の存在下で候補化合物のポリペプチド(またはポリペプチドを発現する細胞もしくは膜)またはその融合蛋白質への結合の競合を測定すること;

(c) 候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によって発生するシグナルを生じるかどうかを、ポリペプチドを発現する細胞または細胞膜に適切な検出システムを用いて試験すること;

(d) 候補化合物を請求項1~3のいずれかに記載のポリペプチドを含む溶液と混合して混合物を調製し、混合物中のポリペプチドの活性を測定し、かつ混合物の活性を候補化合物を含まない対照混合物と比較すること;または

(e) 細胞中の前記ポリペプチドをコードするmRNAまたは前記ポリペプチドの産生に対する候補化合物の効果を、例えばELISAアッセイを用いて検出すること;および

(f) 生物工学的または化学的標準法に従って前記化合物を産生することからなる群より選択される方法を含む方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、以下において「新規ホスホジエステラーゼ7b型(PDE7b)」としばしば呼ばれる、新しく同定されたポリペプチドおよびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、診断においておよび治療上有用となる可能性のあるアゴニスト、アンタゴニストでありうる化合物の同定のためのそれらの使用と、そのようなポリペプチド及びポリヌクレオチドの産生とに関する。

**【0002】****(発明の背景)**

創薬プロセスは現在、「機能ゲノム科学」、すなわちハイスループットのゲノム生物学または遺伝子生物学を取り入れ、根本的改革が進められている。治療標的として遺伝子および遺伝子産物を同定する手段としてのこのアプローチは、「ポジショナルクローニング」に基づく初期のアプローチに速やかに取って代わろうとしている。生体機能または遺伝子の疾患である表現型を同定し、次いでその遺伝子地図上の位置に基づき、担当遺伝子にたどり着くことになる。

**【0003】**

機能ゲノム科学は、現在入手可能な多くの分子生物学データベースから、興味深いと思われる遺伝子配列を同定するために、ハイスループットDNA配列決定法およびバイオインフォマティクスの様々なツールに大きく依存している。創薬のための標的として、さらなる遺伝子およびその関連するポリペプチド/蛋白質を同定し、特徴付けることが継続して必要とされている。

**【0004】****(発明の概要)**

本発明はPDE7b、特にPDE7bポリペプチドおよびPDE7bポリヌクレオチド、組換え物質ならびにそれらの産生法に関する。そのようなポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、環状ヌクレオチドレベルの異常調節に相关联している特定の疾患の治療法に関連して興味を持たれる。そのような疾患には、心循環器疾患、喘息、アレルギー、炎症性疾患、いくつかの免疫関連障害のような、以

下において「本発明の疾患」と呼ばれる疾患が含まれるが、これらに限定されることはない。さらなる態様において、本発明は、本発明によって提供される物質を用いてアゴニストおよびアンタゴニスト（例えば阻害剤）を同定する方法、ならびに同定された化合物によってPDE7bの不均衡に関連する状態を治療する方法に関する。さらなる態様において、本発明は、不適当なPDE7b活性またはレベルに関連する疾患を検出するための診断アッセイに関する。

#### 【0005】

##### （発明の説明）

第一の態様において、本発明はPDE7bポリペプチドに関する。そのようなポリペプチドには下記のものが含まれる：

（a）配列番号1または3に示す配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；

（b）配列番号2または4のポリペプチド配列に少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド配列を含むポリペプチド；

（c）配列番号2または4に示すポリペプチド配列を含むポリペプチド；

（d）配列番号2または4のポリペプチド配列に少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド；

（e）配列番号2または4のポリペプチド配列；および

（f）配列番号2または4に示すポリペプチド配列と比べて0.95、0.96、0.97、0.98、または0.99の同一性指数を有するポリペプチド配列を有する、または含むポリペプチド；

（g）（a）から（f）におけるそのようなポリペプチドの断片および変異体。

#### 【0006】

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドのcAMPホスホジエステラーゼファミリーのメンバーであると考えられている。これらはしたがって、配列がcAMPホスホジエステラーゼ7型の変異体をコードするため興味を持たれる。ホスホジエステラーゼはcAMPの細胞レベルの調節に関与しており、したがって多くの生理学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている。環状ヌクレオチドレベ

ルの異常調節は、心循環器疾患、喘息、アレルギー、炎症性疾患、いくつかの免疫関連障害などの多くの疾患に関係があるとされている。

【0007】

PDE7bの生物学的性質は、以下においては「PDE7bの生物活性」または「PDE7b活性」と呼ぶ。好ましくは本発明のポリペプチドは少なくとも1つのPDE7bの生物活性を示す。

【0008】

本発明のポリペプチドは、すべての対立型およびスプライス変異体を含む、前述のポリペプチドの変異体も含む。そのようなポリペプチドは、保存的もしくは非保存的であってもよい、挿入、欠失、および置換、またはその任意の組合せにより、基準ポリペプチドと異なっている。特に好ましい変異体は、いくつか、例えば、50から30、30から20、20から10、10から5、5から3、3から2、2から1、または1個のアミノ酸が、任意の組合せで挿入、置換、または欠失されているものである。

【0009】

本発明のポリペプチドの好ましい断片は、配列番号2または4のアミノ酸配列から少なくとも30、50もしくは100個の近接アミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、または配列番号2または4のアミノ酸配列から短縮もしくは欠失された少なくとも30、50もしくは100個の近接アミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを含む。好ましい断片は、類似の活性もしくは改善された活性を持つもの、または望ましくない活性が減少したものを含む、PDE7bの生物活性を仲介する生物学的に活性な断片である。同じく、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性である断片が好ましい。

【0010】

本発明のポリペプチドの断片は、ペプチド合成により対応する完全長ポリペプチドを産生するために用いることもできる。したがって、これらの変異体は本発明の完全長ポリペプチドを産生するための中間体として用いることもできる。本発明のポリペプチドは、「成熟」蛋白質の形であってもよく、または前駆体もしくは融合蛋白質などのより大きい蛋白質の一部であってもよい。分泌もしくはリ

ーダー配列、プロ配列、精製に役立つ配列、例えば、複数のヒスチジン残基、または組換え産生中の安定性のための追加配列を含む、追加のアミノ酸配列を含むことがしばしば有利である。

#### 【0011】

本発明のポリペプチドはいかなる適当な様式、例えば、単離型天然原料、発現系（下記参照）を含む遺伝子操作された宿主細胞からの単離により、もしくは例えば自動ペプチド合成機を用いた化学合成により、またはそのような方法の組合せにより調製することができる。そのようなポリペプチドを調製する方法は、当技術分野においてよく知られている。

#### 【0012】

さらなる態様において、本発明はPDE7bポリヌクレオチドに関する。そのようなポリヌクレオチドには下記のものが含まれる：

- (a) 配列番号1または3のポリヌクレオチド配列に少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含むオリヌクレオチド；
- (b) 配列番号1または3のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号1または3のポリヌクレオチドに少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号1または3のポリヌクレオチド；
- (e) 配列番号2または4のポリペプチド配列に少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；
- (f) 配列番号2または4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列；
- (g) 配列番号2または4のポリペプチド配列に少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド；
- (h) 配列番号2または4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
- (i) 配列番号1または3のポリヌクレオチド配列と比べて0.95、0.96

、0.97、0.98または0.99の同一性指数をもつポリヌクレオチド配列を有する、または含むポリヌクレオチド；

(j) 配列番号2または4のポリペプチド配列に比べて0.95、0.96、0.97、0.98または0.99の同一性指数を有するポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を有するか、または含むポリヌクレオチド；および前述のポリヌクレオチドの断片および変異体であるか、または前述のポリヌクレオチドに、その全長にわたり相補的であるポリヌクレオチド。

#### 【0013】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい断片は、配列番号1または3の配列から少なくとも15、30、50もしくは100個の近接ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、または配列番号1または3の配列から短縮もしくは欠失された少なくとも30、50もしくは100個の近接ヌクレオチドを有する配列を含む単離ポリヌクレオチドを含む。

#### 【0014】

本発明のポリヌクレオチドの好ましい変異体は、スプライス変異体、対立変異体、および1つまたは複数の一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドを含む多型を含む。

#### 【0015】

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号2または4のアミノ酸配列を含むポリペプチド変異体であって、いくつか、例えば50から30、30から20、20から10、10から5、5から3、3から2、2から1または1個のアミノ酸残基が、任意の組合せで置換、欠失または付加されているポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドも含む。

#### 【0016】

さらなる態様において、本発明は本発明のDNA配列のRNA転写物であるポリヌクレオチドを提供する。したがって、下記のRNAポリヌクレオチドが提供される：

(a) 配列番号2または4のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物を含むもの；

(b) 配列番号2または4のポリペプチドをコードするDNA配列のRNA転写物であるもの；

(c) 配列番号1または3のDNA配列のRNA転写物を含むもの；または

(d) 配列番号1または3のDNA配列のRNA転写物であるもの；

およびそれらに相補的なRNAポリヌクレオチド。

#### 【0017】

配列番号1または3のポリヌクレオチド配列は、ヒトcAMPホスホジエステラーゼPDE7(PDE7A2)と相同性を示す(Han, P. et al., J. Biol. Chem. 272(26), 16152~16157(1997))。配列番号1または3のポリヌクレオチド配列は、配列番号2または4のポリペプチドをコードするcDNA配列である。配列番号2または4のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号2もしくは4のポリペプチドコーディング配列と同一であってもよく、または遺伝暗号の重複性(縮重)の結果、配列番号2もしくは4のポリペプチドを同様にコードする、配列番号2もしくは4以外の配列であってもよい。配列番号2または4のポリペプチドは、Fehler! Unbekanntes Schalterargumentと相同性および/または構造的類似性を有する、cAMPホスホジエステラーゼファミリーの他の蛋白質に関係している。

#### 【0018】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に、それらの相同ポリペプチドおよびポリヌクレオチドと同様の生物学的機能/性質を有すると予想される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは少なくとも1つのPDE7b活性を有する。

#### 【0019】

本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニング法を用いて脳、腎臓、内皮細胞中のmRNA由来cDNAライブラリから得ることができる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, C

old Spring Harbor, N.Y. (1989))。本発明のポリヌクレオチドはゲノムDNAライブラリなどの天然原料から得ることもでき、またはよく知られている商業的に利用可能な技法を用いて合成することもできる。

#### 【0020】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え産生に用いるとき、ポリヌクレオチドは成熟ポリペプチドのコーディング配列をそれ自体で、あるいは読み枠中に成熟ポリペプチドのコーディング配列を、リーダーもしくは分泌配列、プレ、もしくはプロまたはプレプロ蛋白質配列、あるいは他の融合ペプチド部分などの他のコーディング配列と共に含んでもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を助ける標識配列をコードすることもできる。本発明のこの態様におけるある好ましい実施形態において、標識配列はpQEベクター(Qiagen, Inc.)中に提供され、Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:821~824に記載されているヘキサヒスチジンペプチドであるか、またはHAタグである。ポリヌクレオチドは、転写された非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位ならびにmRNAを安定化する配列などの非コーディング5'および3'配列を含むこともできる。

#### 【0021】

配列番号1または3のポリヌクレオチドと等しい、または十分な同一性を有するポリヌクレオチドを、cDNAおよびゲノムDNAのハイブリダイゼーションプローブとして、または核酸増幅反応(例えばPCR)のプライマーとして用いることもできる。そのようなプローブおよびプライマーは、本発明のポリペプチドをコードする完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離するため、ならびに配列番号1または3に高い配列類似性、概して少なくとも95%の同一性を有する他の遺伝子(ヒト由来のパラログならびにヒト以外の種由来のオルソログおよびパラログをコードする遺伝子を含む)のcDNAおよびゲノムクローンを単離するために用いることもできる。好ましいプローブおよびプライマーは一般には少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドを含むことになり、少なくとも100ヌクレオチドではないとしても少なくとも50ヌク

レオチドを有していてもよい。特に好ましいプローブは30から50個の間のヌクレオチドを有することになる。特に好ましいプライマーは20から25の間のヌクレオチドを有することになる。

#### 【0022】

ヒト以外の種由来のホモログを含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号1または3の配列またはその断片、好ましくは少なくとも15ヌクレオチドを有する標識プローブにより、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でライブラリをスクリーニングする段階と、そのポリヌクレオチド配列を含む完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する段階とを含む方法によって得ることができる。そのようなハイブリダイゼーション法は当業者にはよく知られている。好ましいストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、および20マイクログラム/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中、42℃での終夜インキュベーションの後、約65℃の0.1×SSC中でのフィルターの洗浄を含む。したがって、本発明は、好ましくは少なくとも100個のヌクレオチド配列を有し、配列番号1または3の配列もしくはその断片、好ましくは少なくとも15ヌクレオチドの標識プローブにより、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でライブラリをスクリーニングすることによって得られる単離ポリヌクレオチドも含む。

#### 【0023】

当業者であれば、多くの場合、単離cDNA配列はポリペプチドをコードする領域が5'末端まで完全に伸びていない点で不完全であることを理解するであろう。これは、本質的に「反応性(processivity)」(重合反応中に酵素が鋳型に結合したままでいられる能力の尺度)が低い酵素である逆転写酵素が、第一鎖cDNA合成中にmRNA鋳型のDNAコピーを完了できなかった結果である。

#### 【0024】

完全長cDNAを得るため、または短いcDNAを伸張するために利用可能で

あり、当業者によく知られているいくつかの方法、例えばcDNA末端の迅速増幅(RACE)法に基づくものがある(例えば、Frohman et al., Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998~9002, 1988参照)。典型的な例として例えばMarathon(商標)法(Clonotech Laboratories Inc.)が挙げられるが、最近の技術の改変によってより長いcDNAの検索が著しく単純になった。Marathon(商標)法では、選択された組織から抽出したmRNAからcDNAを調製し、「アダプター」配列を各末端にライゲートしていた。次いで、遺伝子特異的およびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて核酸増幅(PCR)を行い、cDNAの「失われた」5'末端を増幅する。次いで、「ネステッド(nested)」プライマー、すなわち増幅産物の範囲内にアニールするよう設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列のさらに3'にアニールするアダプター特異的プライマーおよび既知の遺伝子配列のさらに5'にアニールする遺伝子特異的プライマー)を用いてPCR反応を繰り返す。この反応の生産物を次いでDNA配列決定により分析し、生産物を既存のcDNAに直接連結して完全な配列を得るか、または5'プライマーの設計のための新しい配列情報を用いて別の完全長PCRを行うことにより、完全長cDNAを構築することができる。

#### 【0025】

本発明の組換えポリペプチドは、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から当業者にはよく知られている方法によって調製することができる。したがって、さらなる態様において、本発明は本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む発現系と、そのような発現系を有する遺伝子操作された宿主細胞と、組換え法による本発明のポリペプチドの産生とに関する。本発明のDNA構築物由来のRNAを用いてそのような蛋白質を産生するために、無細胞翻訳系を用いることもできる。

#### 【0026】

組換え産生のために、宿主細胞を遺伝子操作して本発明のポリヌクレオチドの発現系またはその一部を組み込むことができる。ポリヌクレオチドは、Dav i

s et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrook et al., (同書) などの多くの標準的実験マニュアルに記載の方法によって宿主細胞に導入することができる。宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための好ましい方法には、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質仲介トランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、掻取り負荷、パリスティック導入または感染が含まれる。

#### 【0027】

適当な宿主の代表例には、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、放線菌および枯草菌細胞などの細菌細胞；酵母細胞およびコウジカビ属細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエS2およびハスモンヨトウSf9細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293およびボーズ(Bowes)メラノーマ細胞などの動物細胞；ならびに植物細胞が含まれる。

#### 【0028】

多様な発現系、例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来の系を用いることができ、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入因子由来、酵母染色体因子由来、パキウロウイルス、SV40などのパポバウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルス由来のベクター、ならびにコスミドおよびファージミドなどのプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝因子由来のものなどのその組合せ由来のベクターが挙げられる。発現系は、発現を調節しかつ引き起こす制御領域を含んでいてもよい。一般に、ポリヌクレオチドを維持、伝播または発現して宿主中でポリペプチドを産生することができる、いかなる系またはベクターも用いることができる。適当なポリヌクレオチド配列は、例えば、Sambrook et al., (同書) に記載のものなどの、よく知られておりルーチンで用いられる様々な技法のいずれによっても、発現系に挿入することができる。適当な分泌シグナルを所望のポリペプチドに組み込んで、翻訳された蛋白質を小胞体の内腔、細胞周辺腔、ま

たは細胞外環境に分泌させることができる。これらのシグナルはポリペプチドに内在するものでもよく、または異種シグナルであってもよい。

【0029】

本発明のポリペプチドがスクリーニングアッセイで使用するために発現される場合、ポリペプチドは細胞表面で産生されることが一般に好ましい。この場合、細胞はスクリーニングアッセイで用いる前に回収される。ポリペプチドが培地中に分泌される場合、ポリペプチドを回収し、精製するために培地を回収することができる。細胞内で産生される場合には、ポリペプチドを回収する前にまず細胞を溶解しなければならない。

【0030】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロースクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィおよびレクチンクロマトグラフィを含むよく知られている方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。精製には高性能液体クロマトグラフィを用いることが最も好ましい。細胞内合成、単離および/または精製中にポリペプチドが変性したときには、蛋白質再生のためのよく知られている技法を用いて、活性配座を再生することができる。

【0031】

本発明のポリヌクレオチドは、関連遺伝子の突然変異を検出することを通じて診断試薬として用いることもできる。cDNAおよびゲノム配列中の配列番号1または3のポリヌクレオチドによって特徴付けられ、機能不全に関連している遺伝子の突然変異型を検出することにより、遺伝子の発現不足、過剰発現、または空間的もしくは時間的発現の変化による、疾患または疾患に対する感受性の診断の一助となりうるか、または診断を決定することができる診断ツールが提供される。遺伝子に突然変異を有する個人を、当技術分野においてよく知られている様々な技法によってDNAレベルで検出することができる。

【0032】

診断のための核酸は、血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料などの被検者の細胞から得ることができる。検出のためにゲノムDNAを直接用いてもよく、または分析の前にPCR、好ましくはRT-PCR、もしくは他の増幅法を用いることにより、ゲノムDNAを酵素的に増幅してもよい。RNAまたはcDNAも同様の方法で用いることができる。欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比べて増幅産物のサイズの変化によって検出することができる。点突然変異は増幅したDNAを標識したPDE7bヌクレオチド配列にハイブリダイズすることによって同定することができる。完全にマッチした配列はリボヌクレアーゼ消化によって、または融点の差によってミスマッチ二本鎖と区別することができる。DNA配列の相違は変性剤を含む、もしくは含まないゲルでのDNA断片の電気泳動易動度の変化によって、または直接DNA配列決定によって検出することもできる(例えば、Myers et al., Science (1985) 230: 1242)。特定の部位での配列の変化は、リボヌクレアーゼおよびS1保護などのヌクレアーゼ保護アッセイ、または化学的切断法によって明らかにすることもできる(Cotton et al., Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397~4401)。

#### 【0033】

PDE7bポリヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば遺伝子突然変異の効率的なスクリーニングを行うことができる。そのようなアレイは高密度アレイまたは格子であることが好ましい。アレイ技術による方法はよく知られ、一般的適用性を有しており、遺伝子発現、遺伝連鎖、および遺伝的変異性を含む分子遺伝学の様々な問題に取り組むために用いることができる(例えば、M. Chee et al., Science, 274, 610~613 (1996)およびそこで引用されている他の文献)。

#### 【0034】

異常に低いまたは高いポリペプチドまたはmRNA発現レベルの検出を、本発明の疾患に対する被検者の感受性を診断または決定するために用いることもできる。発現の減少または増加は、例えばPCR、RT-PCRなどの核酸増幅、リ

ポヌクレアーゼ保護、ノーザンブロットイングおよび他のハイブリダイゼーション法などのポリヌクレオチド定量のための当技術分野においてよく知られているいかなる方法を用いてRNAレベルで測定することができる。宿主由来の試料中の、本発明のポリペプチドなどの蛋白質レベルを定量するために用いることができるアッセイ法は、当業者にはよく知られている。そのようなアッセイ法には、ラジオイムノアッセイ、結合蛋白競合アッセイ、ウェスタンブロット分析およびELISAアッセイが含まれる。

【0035】

したがってもう1つの態様において、本発明は下記のものを含む診断キットに関する：

- (a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1または3のヌクレオチド配列、またはその断片もしくはRNA転写物；
- (b) (a)の配列に相補的なヌクレオチド配列；
- (c) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号2または4のポリペプチド；  
あるいは
- (d) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号2または4のポリペプチドの抗体。

【0036】

そのようないかなるキットにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は実質的成分を含みうるということが理解されるであろう。そのようなキットは、疾患または疾患に対する感受性、中でも特に本発明の疾患を診断する際に有用であると考えられる。

【0037】

本発明のポリヌクレオチド配列は、染色体位置決定研究において有用である。この配列は個々のヒト染色体上の特定の位置を特に標的とし、それにハイブリダイズすることができる。本発明に従って染色体に関連する配列のマッピングをすることは、それらの配列を遺伝子関連疾患に相関付ける際の重要な第一段階である。いったん配列を染色体上で正確に位置づけると、染色体上の配列の物理的な位置を遺伝子地図データと相関付けることができる。そのようなデータは、例え

ばV. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで利用可能)に見いだされる。次いで、同じ染色体領域に位置づけられた遺伝子と疾患との間の関係を連鎖解析により同定する(物理的に隣接する遺伝子の共遺伝)。ゲノム配列(遺伝子断片など)のヒト染色体上における正確な位置は、放射線ハイブリッドマッピング(Radiation Hybrid (RH) Mapping) (Walter, M. Spillett, D., Thomas, P., Weissenbach, J., および Goodfellow, P., (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, Nature Genetics 7, 22~28)により決定することができる。いくつかのRHパネル、例えば、GeneBridge4 RHパネル(Hum Mol Genet 1996 Mar; 5(3): 339~46 A radiation hybrid map of the human genome. Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillett D, Muselet D, Prud'Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN)がResearch Genetics (米国アラバマ州ハンツビル)から入手可能である。このパネルを用いて遺伝子の染色体上の位置を決定するために、RH DNA上の目的遺伝子から設計したプライマーを用いて93回のPCRを行う。これらのDNAはそれぞれ、ハムスター環境で維持したランダムヒトゲノム断片を含む(ヒト/ハムスターハイブリッド細胞株)。これらのPCRにより目的遺伝子のPCR産物の有無を示す93のスコアが得られる。これらのスコアを、既知の位置のゲノム配列からのPCR産物を用いて得られたスコアと比較する。この比較は<http://www.genome.wi.mit.edu/>で実施する。本発明の遺伝子はヒト染色体6にマッピングされる。

【0038】

本発明のポリヌクレオチド配列は組織発現研究のための有用なツールでもある。そのような研究は、ポリペプチドをコードするmRNAを検出することにより、組織中のコードされたポリペプチドの発現パターンに関する指標を示しうる、本発明のポリヌクレオチドの発現パターンの調査を可能にする。用いる技法は当技術分野においてよく知られており、cDNAマイクロアレイハイブリダイゼーションなどの、格子上に配列されたクローンに対するインサイチューハイブリダイゼーション法(Schena et al, Science, 270, 467~470, 1995およびShalon et al, Genome Res, 6, 639~645, 1996)およびPCRなどの核酸増幅法が含まれる。好ましい方法はPerkin Elmerから入手可能なTAQMAN(商標)法を用いる。これらの研究結果は生物におけるポリペプチドの正常な機能の指標を提供することができる。加えて、mRNAの正常な発現パターンと、同じ遺伝子の別の型(例えば、ポリペプチドコーディング能における変化または調節突然変異を有するもの)によってコードされるmRNAの発現パターンとの比較研究は、本発明のポリペプチドの役割または疾患におけるその不適切な発現の役割に対する有用な見通しを提供することができる。そのような不適切な発現は、時間的、空間的または単に量的性質のものでありうる。

【0039】

本発明のポリペプチドはFehler! Unbekanntes Schalterargument. で発現される。

【0040】

本発明のさらなる態様は抗体に関する。本発明のポリペプチドもしくはそれらの断片、またはそれらを発現する細胞を、本発明のポリペプチドに対して免疫特異的な抗体を産生するための免疫原として用いることができる。「免疫特異的」なる用語は、抗体が従来技術における他の関連ポリペプチドよりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

【0041】

本発明のポリペプチドに対して生ずる抗体は、ポリペプチドもしくはエピトープを有する断片または細胞を、動物好ましくはヒト以外の動物に、通常のプロト

コルを用いて投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体を調製するために連続細胞株培養によって産生される抗体を提供するいかなる技法も用いることができる。例にはハイブリドーマ法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256: 495~497)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4: 72) およびEBV-ハイブリドーマ法 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 77~96, Alan R. Liss, Inc., 1985) が含まれる。

#### 【0042】

米国特許第4946778号に記載のものなどの、一本鎖抗体を産生する技法を、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を産生するために適合させることもできる。同様に、トランスジェニックマウスまたは他の哺乳動物を含む他の生物を用いて人化抗体を発現することもできる。

#### 【0043】

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

#### 【0044】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドをワクチンとして用いることもできる。したがって、さらなる態様において、本発明は哺乳動物において免疫反応を誘導する方法であって、疾患が個体内ですでに確立されているか否かに関わらず、前記動物を疾患から保護するために、抗体および/または例えば、サイトカイン産生T細胞もしくは細胞傷害性T細胞を含むT細胞免疫反応を起こすのに十分な本発明のポリペプチドを哺乳動物に接種することを含む方法に関する。哺乳動物における免疫反応は、前記動物を本発明の疾患から保護するために抗体を産生するような免疫反応を誘導するために、インビボでポリヌクレオチドの発現を管理し、ポリペプチドをコードするベクターを介して、本発明のポリペプチド

を送達することを含む方法によって誘導することもできる。ベクターを投与する1つの方法は、ベクターを粒子のコーティングとして所望の細胞内に加速すること、またはその他による。そのような核酸ベクターはDNA、RNA、修飾核酸、またはDNA/RNAハイブリッドを含んでいてもよい。ワクチンを使用するために、ポリペプチドまたは核酸ベクターは通常、ワクチン調合物(組成物)として提供されることになる。調合物はさらに適当な担体を含んでいてもよい。ポリペプチドは胃で分解されると考えられるため、非経口(例えば、皮下、筋肉内、静脈内、または皮内注射)で投与することが好ましい。非経口投与に適した調合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および調合物を受容者の血液と等張にするための溶質を含んでいてもよい水性および非水性無菌注射溶液;ならびに懸濁化剤または増粘剤を含んでいてもよい水性および非水性無菌懸濁液が含まれる。調合物は単位用量または多用量容器、例えば、密封アンプルおよびバイアルで提供することもでき、使用直前に無菌液状担体を加えるだけの凍結乾燥状態で保存することもできる。ワクチン調合物は、水中油系および当技術分野において知られている他の系などの、調合物の免疫原性を増強するためのアジュバント系を含んでいてもよい。用量はワクチンの具体的活性によって異なり、通常の実験により容易に決定することができる。

#### 【0045】

本発明のポリペプチドは、1つまたは複数の疾患状態、特に前述の本発明の疾患に関連する、1つまたは複数の生物機能を有する。したがって、ポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害する化合物を同定することは有用である。したがって、さらなる態様において、本発明はポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害するものを同定するための化合物のスクリーニング法を提供する。そのような方法は、前述の本発明の疾患の治療および予防を目的として用いることができるアゴニストまたはアンタゴニストを同定する。化合物は様々な原料、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリ、化合物コレクション、および天然物の混合物から同定することができる。そのようにして同定されたアゴニストまたはアンタゴニストは、場合により、ポリペプチドの天然もしくは修飾基質、リガンド、受容体、酵素など;その構造的もしくは機能的類似物(Co-li

gan et al., Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5 (1991) 参照) または小分子でありうる。

#### 【0046】

スクリーニング法は、ポリペプチド、またはポリペプチドを有する細胞もしくは膜、あるいはその融合蛋白質への候補化合物の結合を、候補化合物に直接または間接的に結合された標識によって単純に測定することができる。あるいは、スクリーニング法は候補化合物のポリペプチドへの標識競合物質(例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト)に対する競合結合の測定または検出(定性的または定量的)を含むこともできる。さらに、これらのスクリーニング法は、ポリペプチドを有する細胞に適した検出系を用いて、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によりシグナルを生じるかどうかを試験することもできる。活性化阻害剤は一般に、既知のアゴニスト存在下で検定し、候補化合物存在下でのアゴニストによる活性化への効果を観察する。さらに、スクリーニング法は、候補化合物を本発明のポリペプチドを含む溶液と混合して混合物を生成する段階と、混合物中のPDE7b活性を測定する段階と、混合物のPDE7b活性を候補化合物を含まない対照混合物と比較する段階とを単に含んでもよい。

#### 【0047】

本発明のポリペプチドは、通常の高容量スクリーニング法で用いることもでき、同様にハイスループットスクリーニング(HTS)様式で用いることもできる。そのようなHTS様式は96穴、および最近では384穴マイクロタイタープレートに十分に確立された使用のみならず、Schullek et al., Anal Biochem., 246, 20~29, (1997)に記載のナノウェル法などの、新しく現れつつある方法も含む。

#### 【0048】

前述のFc部分およびPDE7bポリペプチドから生成されるものなどの融合蛋白質を、本発明のポリペプチドのアンタゴニストを同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイのために用いることもできる(D. Bennett et al., J Mol Recognition, 8: 52~58 (1

995); および K. Johanson et al., J Biol Chem, 270(16): 9459~9471 (1995)。

#### 【0049】

##### スクリーニング法

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびポリペプチドに対する抗体は、細胞内の mRNA およびポリペプチドの産生に対する、加えられた化合物の効果を検出するためのスクリーニング法を設定するために用いることもできる。例えば、当技術分野において知られている標準的方法により、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて、分泌された、または細胞関連のポリペプチドのレベルを測定するために、ELISA アッセイを構築することができる。これは、適当に操作された細胞または組織から、ポリペプチドの産生を阻害または促進しうる物質（それぞれ、アンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる）を見いだすために用いることができる。

#### 【0050】

本発明のポリペプチドを用いて、当技術分野において知られている標準的受容体結合法により、膜結合または可溶性受容体があればそれを同定することができる。これらには、ポリペプチドを放射性同位体（例えば、 $^{125}\text{I}$ ）で標識するか、化学的に修飾する（例えば、ビオチン化）か、または検出もしくは精製に適したペプチド配列に融合し、かつ推定受容体源（細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液）とインキュベートする、リガンド結合および架橋アッセイが含まれるが、これらに限定されることはない。他の方法には、表面プラズモン共鳴などの生物物理的技法および分光法が含まれる。これらのスクリーニング法を用いて、ポリペプチドと、その受容体がある場合にはそれとの結合に競合するポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定することもできる。そのようなアッセイを実施するための標準的方法は当技術分野においてよく理解されている。

#### 【0051】

本発明のポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体または、ある場合には、ポリペプチドの、場合によってはリガンド、基質、受容体、酵素などに密接に関連しているオリゴヌクレオチドもしくは蛋白質、例えば、リガンド、基質、受

容体、酵素などの断片、あるいは本発明のポリペプチドに結合するが、応答を引き出すことはないため、ポリペプチドの活性が妨げられる小分子が含まれる。

#### 【0052】

スクリーニング法はまた、トランスジェニック技法およびPDE7b遺伝子の使用を含んでもよい。トランスジェニック動物を作製する技術は十分に確立されている。例えば、PDE7b遺伝子を、受精卵母細胞の雄性前核へのマイクロインジェクション、着床前もしくは後の胚へのレトロウイルスによる移入、または、電気穿孔法などにより遺伝子修飾された胚幹細胞の注入を通じて宿主未分化胚細胞に導入することもできる。特に有用なトランスジェニック動物は、いわゆる「ノックイン」動物で、その動物のゲノム内で動物遺伝子がヒトの等価遺伝子と置換されている。ノックイントランスジェニック動物は創薬プロセスにおいて、化合物がヒト標的に特異的である場合の標的の有効性確認のために有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、いわゆる「ノックアウト」動物で、本発明のポリペプチドの動物オルソログであり、細胞の内在性DNA配列によってコードされるオルソログの発現が部分的または完全に廃絶されている。遺伝子ノックアウトは、特定の細胞もしくは組織を標的とすることができ、技術に限界があるために特定の細胞もしくは組織でしか起こり得ないか、または動物のすべての、もしくは実質的にすべての細胞で起こりうる。トランスジェニック動物技術は、導入遺伝子が発現されて大量の本発明のポリペプチドが得られる、全動物発現 - クローニング系も提供する。

#### 【0053】

前述の方法で使用するためのスクリーニングキットは、本発明のさらなる態様を形成する。そのようなスクリーニングキットは、

- (a) 本発明のポリペプチド；
- (b) 本発明のポリペプチドを発現する組換え細胞；
- (c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞膜；または
- (d) 本発明のポリペプチドに対する抗体を含み、ただしポリペプチドは配列番号2または4のものであることが好ましい。

#### 【0054】

そのようなキットのいずれにおいても、(a)、(b)、(c)または(d)は実質的な成分を含みうるということが理解されるであろう。

【0055】

用語

下記の定義は上で頻繁に用いられている特定の用語の理解を助けるために示すものである。

【0056】

本明細書において用いられる「抗体」は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、および人化抗体、ならびにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリの生成物を含むFab断片を含む。

【0057】

「単離された」とは、その天然型から「人の手によって」変更された、すなわち、それが天然に生成する場合、その元の環境から変えられたかもしくは取り出された、またはその両方であることを意味する。例えば、生物中に自然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されて」いないが、その自然状態の共存物質から分離された、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書においてこの用語が用いられるとおり、「単離されて」いる。さらに、形質転換、遺伝子操作または任意の他の組換え法によって生物に導入されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それが前記生物（生物は生きていても生きていなくてもよい）中に存在しているままであっても、「単離されて」いる。

【0058】

「ポリヌクレオチド」は一般に、いかなるポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)をも意味し、非修飾または修飾RNAまたはDNAであってもよい。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖もしくは、より典型的には二本鎖、または一本鎖および二本鎖領域の混合物であってもよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が含まれるが、これらに限定されることはない。加えて、「ポリヌクレオチド」はRNAもしくはDNAまた

はRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域を意味する。「ポリヌクレオチド」なる用語には、1つまたは複数の修飾塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性またはその他の理由から主鎖が修飾されているDNAまたはRNAも含まれる。「修飾」塩基には、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどのまれな塩基が含まれる。様々な修飾をDNAおよびRNAに施すことができる。したがって、「ポリヌクレオチド」は天然に典型的に見いだされるポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に修飾された型、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学型を含む。「ポリヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチドとしばしば呼ばれる比較的短いポリヌクレオチドも含む。

#### 【0059】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわちペプチドイソステアによって相互に連結された複数のアミノ酸を含む、いかなるポリペプチドも意味する。「ポリペプチド」とは、一般にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および一般に蛋白質と呼ばれる長鎖の両方を意味する。ポリペプチドは20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができる。「ポリペプチド」には、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセス、または当技術分野においてよく知られている化学的修飾法のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列が含まれる。そのような修飾は基礎的な教科書や、より詳細な研究書、ならびに膨大な研究文献に詳しく記載されている。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、およびアミノまたはカルボキシル末端を含む、ポリペプチドのいかなる位置でなされてもよい。所与のポリペプチドのいくつかの部位で、同じ型の修飾が、同程度または異なる程度で存在しうることは理解されるであろう。また、所与のポリペプチドは、多くの型の修飾を含んでいてもよい。ユビキチン化の結果、ポリペプチドが分枝してもよく、分枝を有するまたは有していない環状であってもよい。環状、分枝および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後の天然プロセスによって生じることもあり、または合成的方法によって調製することもできる。修飾にはアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ビオチン化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジル

イノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、ガンマ - カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、蛋白質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などの蛋白質へのアミノ酸の転移RNA仲介による付加、およびユビキチン化が含まれる(例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1~12, in Post-translational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., 「Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors」, Meth Enzymol, 182, 626~646, 1990, および Rattan et al., 「Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging」, Ann NY Acad Sci, 663, 48~62, 1992)。

#### 【0060】

ポリペプチド配列の「断片」とは、基準配列よりも短い、基準ポリペプチドと基本的に同じ生物機能または活性を保持しているポリペプチド配列を意味する。ポリヌクレオチド配列の「断片」は、配列番号1または3の基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列を意味する。

#### 【0061】

「変異体」とは、基準ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、その基本的性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。

ポリヌクレオチドの典型的変異体は、基準ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なっている。変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることもあれば、変えないこともある。ヌクレオチドの変化によって、後述するとおり、基準配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および短縮が起こることもある。ポリペプチドの典型的変異体は、基準ポリペプチドとアミノ酸配列が異なっている。一般に、変化は限られており、基準ポリペプチドおよび変異体の配列は全体として非常に類似しており、多くの領域で同等である。変異体および基準ポリペプチドは、1つまたは複数の置換、挿入、欠失の任意の組合せによってアミノ酸配列が異なってもよい。置換または挿入アミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされるものであってもよく、そうでなくてもよい。典型的な保存的置換には、Gly、Ala；Val、Ile、Leu；Asp、Glu；Asn、Gln；Ser、Thr；Lys、Arg；ならびにPheおよびTyrが含まれる。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子などの天然に生じるものでもよく、または天然に生じることが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然変異体は、突然変異誘発法または直接的合成によって調製することができる。同様に、変異体として含まれるものには、1つまたは複数の翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、リン酸化、メチル化、ADPリボシル化などを有するポリペプチドがある。本発明の実施形態は、N末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化ならびにC末端グリシンの修飾を含む。

【0062】

「対立遺伝子」とは、ゲノムの所与の遺伝子座における遺伝子の複数の別の型の1つを意味する。

【0063】

「多型」とは、集団内のゲノムの所与の位置におけるヌクレオチド配列（および適切な場合にはコードされたポリペプチド配列）の変型を意味する。

【0064】

「一塩基多型」（SNP）とは、集団内のゲノムの1つのヌクレオチドの位置

でヌクレオチド変異性が出現することを意味する。SNPはゲノムの1つの遺伝子内で起こることもあれば、遺伝子間領域で起こることもある。SNPは対立遺伝子特異的増幅(ASA)を用いてアッセイすることができる。この方法のためには、少なくとも3つのプライマーが必要とされる。共通プライマーはアッセイする多型に対する逆相補で用いる。この共通プライマーは多型塩基から50から1500bpの間でありうる。他の2つ(またはそれ以上)のプライマーは、最後の3'塩基がゆらいで、多型をなす対立遺伝子の2つ(またはそれ以上)のうちの1つにマッチする以外は、お互いに同等である。次いで、試料DNAに対して2回(またはそれ以上)のPCR反応を、それぞれ共通プライマーと対立遺伝子特異的プライマーの1つを用いて実施する。

#### 【0065】

本明細書において用いられる「スプライス変異体」とは、最初は同じゲノムDNA配列から転写されたが、別のRNAスプライシングを受けたRNA分子から生成したcDNAを意味する。別のRNAスプライシングは最初のRNA転写物が、一般にはイントロンの除去のためにスプライシングを受けるときに起こり、その結果、それぞれが異なるアミノ酸配列をコードしうる複数のmRNA分子を生ずる。スプライス変異体なる用語は、前述のcDNA分子によってコードされる蛋白質も意味する。

#### 【0066】

「同一性」とは、配列を比較することによって決められた、複数のポリペプチド配列または複数のポリヌクレオチド配列の関係を表す。一般に、同一性とは、比較する配列の全長にわたり、2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列の、それぞれ厳密なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の対応を意味する。

#### 【0067】

「同一性%」 - 厳密な対応がない配列については「同一性%」を求めることができる。一般に、比較する2つの配列をアライメントし、配列間の最大の相関を得る。この際、一方または両方の配列に「ギャップ」を挿入して、アライメントの程度を高めることもできる。比較する各配列の全長にわたって同一性%を求め

ることもでき(いわゆるグローバルアライメント)、これは長さが同じもしくは非常に近い配列に特に適しており、または短い、規定の長さで求めることもでき(いわゆるローカルアライメント)、これは長さが異なる配列に対しより適している。

#### 【0068】

「類似性」は、2つのポリペプチド配列間の関係のさらに、より高度な尺度である。一般に「類似性」とは、2つのポリペプチド鎖のアミノ酸の間で、比較する各配列からの残基対の間の厳密な対応(同一性と同じく)だけでなく、厳密な対応がない場合に、進化に基づき、1つの残基が別のものに置換されているかどうかをも考慮に入れて、残基ごとに比較することを意味する。この見込みには関連する「スコア」がありそれから2つの配列の「類似性%」を求めることができる。

#### 【0069】

複数の配列の同一性および類似性を比較する方法は、当技術分野においてよく知られている。したがって、例えばWisconsin Sequence Analysis Package、version 9.1(Devereux et al, Nucleic Acids Res, 12, 387~395, 1984、Genetics Computer Group, 米国ウィスコンシン州マディソンから入手可能)で利用できるプログラム、例えばBESTFITおよびGAPなるプログラムを用いて2つのポリヌクレオチド間の同一性%や、2つのポリペプチド配列間の同一性%および類似性%を求めることができる。BESTFITはSmithおよびWaterman(J Mol Biol, 147, 195~197, 1981、Advances in Applied Mathematics, 2, 482~489, 1981)の「局所ホモロジー」アルゴリズムを用いており、2つの配列間の類似度の最もよい一領域を見つける。BESTFITは長さが異なる2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列を比較するのにより適しており、このプログラムは短い方の配列が長い方の一部であると仮定する。これに対して、GAPは2つの配列のアライメントを行い、NeddllemanおよびWunschのアルゴリズム(J Mo

l Biol, 48, 443~453, 1970)に従って「最大の類似性」を見つける。GAPはほぼ同じ長さの配列を比較するのにより適しており、アライメントは全長にわたって行われると考えられる。各プログラムで用いられるパラメーター「ギャップウェイト (Gap Weight)」および「鎖長ウェイト (Length Weight)」はそれぞれ、ポリヌクレオチド配列では50および3、ポリペプチド配列では12および4であることが好ましい。同一性および類似性%は、比較する2つの配列が最適にアライメントされているときに求めることが好ましい。

#### 【0070】

配列間の同一性および/または類似性を求めるための他のプログラムも当技術分野において知られており、例えば、BLASTプログラムファミリー (Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403~410, 1990、Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:389~3402, 1997、米国バイオテクノロジー情報センター (NCBI)、米国メリーランド州ベセスダから入手可能で、NCBIのホームページ [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) でアクセス可能) およびFASTA (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63~99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444~2448, 1998、Wisconsin Sequence Analysis Packageの一部として入手可能) がある。

#### 【0071】

比較前にヌクレオチド配列をアミノ酸配列にまず翻訳する場合を含む、ポリペプチド配列の比較においては、BLOSUM62アミノ酸置換マトリクス (Henikoff S and Henikoff J G, Proc. Nat. Acad Sci. USA, 89, 10915~10919, 1992) を用いることが好ましい。

#### 【0072】

基準ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対してクエリーポリヌクレオ

チドまたはポリペプチド配列の同一性%を求めるために、プログラムBESTFITを用い、クエリーおよび基準配列は最適にアライメントされ、プログラムのパラメーターは前述のとおり、デフォルト値に設定されていることが好ましい。

#### 【0073】

「同一性指数」は、候補配列（ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）と基準配列とを比較するために用いることができる配列の関連性の尺度である。したがって、例えば、基準ポリヌクレオチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指数を有する候補ポリヌクレオチド配列は、候補ポリヌクレオチド配列が基準配列のそれぞれ100ヌクレオチドごとに平均で5つまでの相違を含みうるということを除き、基準配列と同一である。そのような相違は少なくとも1つのヌクレオチド欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群より選択される。これらの相違は、基準ポリヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位で、またはこれらの末端位の間のかなる位置でも、基準配列中のヌクレオチドの間で個々に散在して、または基準配列中の1つまたは複数の隣接グループで起こりうる。すなわち、基準ポリヌクレオチド配列と比較して0.95の同一性指数を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、前述のとおり、基準配列のヌクレオチド100個ごとに平均5個までが欠失、置換もしくは挿入される、またはその任意の組合せが起きてもよい。同じことが同一性指数の他の値、例えば0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要な変更を加えてあてはまる。

#### 【0074】

同様に、ポリペプチドについては、基準ポリペプチド配列と比較して、例えば0.95の同一性指数を有する候補ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列が基準配列のそれぞれ100アミノ酸ごとに平均で5つまでの相違を含みうるということを除き、基準配列と同一である。そのような相違は少なくとも1個のアミノ酸欠失、保存的および非保存的置換を含む置換、または挿入からなる群より選択される。これらの相違は、基準ポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシ末端位で、またはこれらの末端位の間のかなる位置でも、基準配列中のアミノ酸の間で個々に散在して、または基準配列中の1つまたは複数の隣接グループで起

こりうる。すなわち、基準ポリペプチド配列と比較して0.95の同一性指数を有するポリペプチド配列を得るためには、前述のとおり、基準配列のアミノ酸100個ごとに平均5個までが欠失、置換もしくは挿入される、またはその任意の組合せが起こってもよい。同じことが同一性指数の他の値、例えば0.96、0.97、0.98および0.99についても、必要な変更を加えてあてはまる。

#### 【0075】

ヌクレオチドまたはアミノ酸の相違の数と同一性指数との間の関係は下記の式で表すことができる：

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

上式で、

$n_a$ はヌクレオチドまたはアミノ酸の相違の数であり、

$x_a$ は配列番号2または4におけるそれぞれヌクレオチドまたはアミノ酸の合計数であり、

$I$ は同一性指数であり、

$\cdot$ は乗法演算子の記号であり、かつ

上式で、 $x_a$ と $I$ との積が非整数となる場合にはいかなる値でも、 $x_a$ から減ずる前に最も近い整数に切り捨てる。

#### 【0076】

「ホモログ」は、基準配列に対し高度の配列関連性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を示すために、当技術分野において用いられる総称である。そのような関連性は、前述のとおり、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を求めることによって定量することができる。「オルソログ」および「パラログ」なる用語も、この総称の範囲内に入る。「オルソログ」とは、もう1つの種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価物であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。「パラログ」とは、同じ種内で機能的に類似のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。

#### 【0077】

「融合蛋白質」とは、2つの、無関係の融合遺伝子またはその断片によってコードされる蛋白質を意味する。例は米国特許第5541087号、米国特許第5

726044号に開示されている。Fc-PDE7bの場合、そのような融合蛋白質を治療に用いるときに、その薬動学的性質を改善し、かつ二量体PDE7bを生成するために、融合蛋白質の一部として免疫グロブリンFc領域を用いることは、Fc-PDE7bの機能的発現を実施する際に有利である。Fc-PDE7bのDNA構築物は、5'から3'の方向に、分泌カセット、すなわち哺乳動物細胞からの輸送を引き起こすシグナル配列、融合相手として、免疫グロブリンFc領域断片をコードするDNA、およびFc-PDE7bをコードするDNAを含む。いくつかの使用において、機能的Fcサイトを突然変異させる一方で、融合蛋白質の残りはそのまま残す、または発現後にFc部分を完全に欠失することにより、固有の機能的性質（相補結合、Fc受容体結合）を変更できることが望ましいであろう。

【0078】

特許および特許出願を含むが、これらに限定されることはない、本明細書において引用したすべての出版物および参考文献は、それぞれ個々の出版物または参考文献について、具体的かつ個別に参考として本明細書に組み込むと示しているかのごとくに、その全体を参考として本明細書に組み込む。本出願がそれに対して優先権を主張する、いかなる特許出願も、出版物および参考文献について前述した様式で、その全体を参考として本明細書に組み込む。

【0079】

様々なヒト組織および臓器におけるPDE7bポリペプチドmRNAの発現分析を、実施例1に示すとおりに実施した。図1に示す組織および臓器は下記のとおりである：

- 1 脳
- 2 胎児脳
- 3 胎児肝臓
- 4 心臓
- 5 腎臓
- 6 肝臓
- 7 肺

- 8 膵臓
- 9 前立腺
- 10 骨格筋
- 11 小腸
- 12 脾臓
- 13 精巣
- 14 子宮。

【0080】

さらなる実施例

実施例1

新規PDE7bの組織分布を、次の一連の実験中に調べた：新規PDE7bをコードするcDNAを、ベクターと共にあるプライマーを用いてPCRにより増幅し、得られたPCR産物を複数のフィルターにスポットした。異なる正常ヒト組織（図に示すとおり）由来のcDNAを33Pで標識し、これを用いてフィルターにハイブリダイズした。フィルターをホスホイメージャーで計数し、得られたカウントを各フィルター上の全カウントに対して補正した。各組織のcDNAを少なくとも2回ずつハイブリダイズした。

【0081】

新規PDE7bは分析したすべての組織で中等度のレベルまでは認められ、最高値は胎児肝臓、心臓および肝臓で得られた。

【図面の簡単な説明】

【図1】

PDE7bの発現パターンを示す図である。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Merck Patent GmbH  
 5 <120> New PDE7B  
 <130> newpd7b  
 10 <140>  
 <141>  
 <160> 4  
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 1353  
 <212> DNA  
 20 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1353)  
 25 <400> 1  
 atg tct tgt tta atg gtt gag agg tgt ggc gaa atc ttg ttt gag aac 48  
 Met Ser Cys Leu Met Val Glu Arg Cys Gly Glu Ile Leu Phe Glu Asn  
 1 5 10 15  
 30 ccc gat cag aat gcc aaa tgt gtt tgc atg ctg gga gat ata cga cta 96  
 Pro Asp Gln Asn Ala Lys Cys Val Cys Met Leu Gly Asp Ile Arg Leu  
 20 25 30  
 35 agg ggt cag acg ggg gtt cgt gct gaa cgc cgt ggc tcc tac cca ttc 144  
 Arg Gly Gln Thr Gly Val Arg Ala Glu Arg Arg Gly Ser Tyr Pro Phe  
 35 40 45  
 40 att gac ttc cgc cta ctt aac agt aca aca tac tca ggg gag att ggc 192  
 Ile Asp Phe Arg Leu Leu Asn Ser Thr Thr Tyr Ser Gly Glu Ile Gly  
 50 55 60  
 acc aag aaa aag gtg aaa aga cta tta agc ttt caa aga tac ttc cat 240  
 Thr Lys Lys Lys Val Lys Arg Leu Leu Ser Phe Gln Arg Tyr Phe His  
 45 65 70 75 80  
 gca tca agg ctg ctt cgt gga att ata cca caa gcc cct ctg cac ctg 288  
 Ala Ser Arg Leu Leu Arg Gly Ile Ile Pro Gln Ala Pro Leu His Leu  
 85 90 95  
 50 ctg gat gaa gac tac ctt gga caa gca agg cat atg ctc tcc aaa gtg 336  
 Leu Asp Glu Asp Tyr Leu Gly Gln Ala Arg His Met Leu Ser Lys Val  
 100 105 110  
 55 gga atg tgg gat ttt gac att ttc ttg ttt gat cgc ttg aca aat gga 384  
 Gly Met Trp Asp Phe Asp Ile Phe Leu Phe Asp Arg Leu Thr Asn Gly  
 115 120 125  
 aac agc ctg gta aca ctg ttg tgc cac ctc ttc aat acc cat gga ctc 432

	Asn	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Cys	His	Leu	Phe	Asn	Thr	His	Gly	Leu	
	130						135					140					
5	att	cac	cat	ttc	aag	tta	gat	atg	gtg	acc	tta	cac	cga	ttt	tta	gtc	480
	Ile	His	His	Phe	Lys	Leu	Asp	Met	Val	Thr	Leu	His	Arg	Phe	Leu	Val	
	145					150					155				160		
10	atg	ggt	caa	gaa	gat	tac	cac	agc	caa	aac	ccg	tat	cac	aat	gct	ggt	528
	Met	Val	Gln	Glu	Asp	Tyr	His	Ser	Gln	Asn	Pro	Tyr	His	Asn	Ala	Val	
					165					170					175		
15	cac	gca	gcc	gac	gtc	acc	cag	gcc	atg	cac	tgc	tac	ctg	aaa	gag	cca	576
	His	Ala	Ala	Asp	Val	Thr	Gln	Ala	Met	His	Cys	Tyr	Leu	Lys	Glu	Pro	
				180				185						190			
20	aag	ctt	gcc	agc	ttc	ctc	acg	cct	ctg	gac	atc	atg	ctt	gga	ctg	ctg	624
	Lys	Leu	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Pro	Leu	Asp	Ile	Met	Leu	Gly	Leu	Leu	
			195					200				205					
25	gct	gca	gca	gca	cac	gat	gtg	gac	cac	cca	ggg	gtg	aac	cag	cca	ttt	672
	Ala	Ala	Ala	Ala	His	Asp	Val	Asp	His	Pro	Gly	Val	Asn	Gln	Pro	Phe	
	210						215					220					
30	ttg	ata	aaa	act	aac	cac	cat	ctt	gca	aac	cta	tat	cag	aat	atg	tct	720
	Leu	Ile	Lys	Thr	Asn	His	His	Leu	Ala	Asn	Leu	Tyr	Gln	Asn	Met	Ser	
	225					230					235				240		
35	gtg	ctg	gag	aat	cat	cac	tgg	cga	tct	aca	att	ggc	atg	ctt	cga	gaa	768
	Val	Leu	Glu	Asn	His	His	Trp	Arg	Ser	Thr	Ile	Gly	Met	Leu	Arg	Glu	
				245					250						255		
40	tca	agg	ctt	ctt	gct	cat	ttg	cca	aag	gaa	atg	aca	cag	gat	att	gaa	816
	Ser	Arg	Leu	Leu	Ala	His	Leu	Pro	Lys	Glu	Met	Thr	Gln	Asp	Ile	Glu	
				260					265					270			
45	cag	cag	ctg	ggc	tcc	ttg	atc	ttg	gca	aca	gac	atc	aac	agg	cag	aat	864
	Gln	Gln	Leu	Gly	Ser	Leu	Ile	Leu	Ala	Thr	Asp	Ile	Asn	Arg	Gln	Asn	
			275					280					285				
50	gaa	ttt	ttg	acc	aga	ttg	aaa	gct	cac	ctc	cac	aat	aaa	gac	tta	aga	912
	Glu	Phe	Leu	Thr	Arg	Leu	Lys	Ala	His	Leu	His	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	
	290						295					300					
55	ctg	gag	gat	gca	cag	gac	agg	cac	ttt	atg	ctt	cag	atc	gcc	ttg	aag	960
	Leu	Glu	Asp	Ala	Gln	Asp	Arg	His	Phe	Met	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Lys	
	305					310					315				320		
60	tgt	gct	gac	att	tgc	aat	cct	tgt	aga	atc	tgg	gag	atg	agc	aag	cag	1008
	Cys	Ala	Asp	Ile	Cys	Asn	Pro	Cys	Arg	Ile	Trp	Glu	Met	Ser	Lys	Gln	
				325						330					335		
65	tgg	agt	gaa	agg	gtc	tgt	gaa	gaa	ttc	tac	agg	caa	ggt	gaa	ctt	gaa	1056
	Trp	Ser	Glu	Arg	Val	Cys	Glu	Glu	Phe	Tyr	Arg	Gln	Gly	Glu	Leu	Glu	
				340					345					350			
70	cag	aaa	ttt	gaa	ctg	gaa	atc	agt	cct	ctt	tgt	aat	caa	cag	aaa	gat	1104
	Gln	Lys	Phe	Glu	Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Leu	Cys	Asn	Gln	Gln	Lys	Asp	
			355					360					365				
75	tcc	atc	cct	agt	ata	caa	att	ggc	ttc	atg	agc	tac	atc	gtg	gag	ccg	1152
	Ser	Ile	Pro	Ser	Ile	Gln	Ile	Gly	Phe	Met	Ser	Tyr	Ile	Val	Glu	Pro	



```

Ser Arg Leu Leu Ala His Leu Pro Lys Glu Met Thr Gln Asp Ile Glu
                260                265                270
Gln Gln Leu Gly Ser Leu Ile Leu Ala Thr Asp Ile Asn Arg Gln Asn
                275                280                285
5  Glu Phe Leu Thr Arg Leu Lys Ala His Leu His Asn Lys Asp Leu Arg
    290                295                300
Leu Glu Asp Ala Gln Asp Arg His Phe Met Leu Gln Ile Ala Leu Lys
305                310                315                320
10 Cys Ala Asp Ile Cys Asn Pro Cys Arg Ile Trp Glu Met Ser Lys Gln
    325                330                335
Trp Ser Glu Arg Val Cys Glu Glu Phe Tyr Arg Gln Gly Glu Leu Glu
    340                345                350
Gln Lys Phe Glu Leu Glu Ile Ser Pro Leu Cys Asn Gln Gln Lys Asp
    355                360                365
15 Ser Ile Pro Ser Ile Gln Ile Gly Phe Met Ser Tyr Ile Val Glu Pro
    370                375                380
Leu Phe Arg Glu Trp Ala His Phe Thr Gly Asn Ser Thr Leu Ser Glu
385                390                395                400
20 Asn Met Leu Gly His Leu Ala His Asn Lys Lys Ala Gln Trp Lys Ser Leu
    405                410                415
Leu Pro Arg Gln His Arg Ser Arg Gly Ser Ser Gly Ser Gly Pro Asp
    420                425                430
His Asp His Ala Gly Gln Gly Thr Glu Ser Glu Glu Gln Glu Gly Asp
    435                440                445
25 Ser Pro
    450

30 <210> 3
    <211> 1175
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens

35 <220>
    <221> CDS
    <222> (3)..(1175)

    <400> 3
40 gg cac gag agg aga gag aga gag aga gag cgc cta ctt aac agt aca 47
    His Glu Arg Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Leu Leu Asn Ser Thr
    1 5 10 15

aca tac tca ggg gag att ggc acc aag aaa aag gtg aaa aga cta tta 95
45 Thr Tyr Ser Gly Glu Ile Gly Thr Lys Lys Lys Val Lys Arg Leu Leu
    20 25 30

agc ttt caa aga tac ttc cat gca tca agg ctg ctt cgt gga att ata 143
50 Ser Phe Gln Arg Tyr Phe His Ala Ser Arg Leu Leu Arg Gly Ile Ile
    35 40 45

cca caa gcc cct ctg cac ctg ctg gat gaa gac tac ctt gga caa gca 191
Pro Gln Ala Pro Leu His Leu Leu Asp Glu Asp Tyr Leu Gly Gln Ala
    50 55 60

55 agg cat atg ctc tcc aaa gtg gga atg tgg gat ttt gac att ttc ttg 239
Arg His Met Leu Ser Lys Val Gly Met Trp Asp Phe Asp Ile Phe Leu
    65 70 75

60 ttt gat cgc ttg aca aat gga aac agc ctg gta aca ctg ttg tgc cac 287
Phe Asp Arg Leu Thr Asn Gly Asn Ser Leu Val Thr Leu Leu Cys His

```

	80		85		90		95	
	ctc ttc aat acc cat gga ctc att cac cat ttc aag tta gat atg gtg							335
5	Leu Phe Asn Thr		His Gly Leu Ile		His His Phe Lys Leu		Asp Met Val	
			100		105		110	
	acc tta cac cga ttt tta gtc atg gtt caa gaa gat tac cac agc caa							383
	Thr Leu His		Arg Phe Leu Val Met Val		Gln Glu Asp Tyr		His Ser Gln	
10			115		120		125	
	aac ccg tat cac aat gct gtt cac gca gcc gac gtc acc cag gcc atg							431
	Asn Pro Tyr His		Asn Ala Val His Ala Ala		Asp Val Thr Gln Ala Met			
			130		135		140	
15	cac tgc tac ctg aaa gar cca aag ctt gcc agc ttc ctc acg cct ctg							479
	His Cys Tyr Leu		Lys Glu Pro Lys Leu Ala		Ser Phe Leu Thr Pro Leu			
			145		150		155	
20	gac atc atg ctt gga ctg ctg gct gca gca gca cac gat gtg gac cac							527
	Asp Ile Met Leu Gly		Leu Leu Ala Ala Ala		His Asp Val Asp His			
			165		170		175	
25	cca ggg gtg aac cag cca ttt ttg ata aaa act aac cmc cat ctt gca							575
	Pro Gly Val Asn		Gln Pro Phe Leu Ile Lys Thr		Asn Xaa His Leu Ala			
			180		185		190	
30	aac cta tat cag aat atg tct gtg ctg gag aat cat cac tgg cga tct							623
	Asn Leu Tyr Gln		Asn Met Ser Val Leu Glu		Asn His His Trp Arg Ser			
			195		200		205	
35	aca att ggc atg ctt cga gaa tca agg ctt ctt gct cat ttg cca aag							671
	Thr Ile Gly Met Leu		Arg Glu Ser Arg Leu Leu		Ala His Leu Pro Lys			
			210		215		220	
40	gaa atg aca cag gat att gaa cag cag ctg ggc tcc ttg atc ttg gca							719
	Glu Met Thr Gln Asp		Ile Glu Gln Gln Leu Gly		Ser Leu Ile Leu Ala			
			225		230		235	
45	aca gac atc aac agg cag aat gaa ttt ttg acc aga ttg aaa gct cac							767
	Thr Asp Ile Asn Arg		Gln Asn Glu Phe Leu Thr Arg		Leu Lys Ala His			
			240		245		250	255
50	ctc cac aat aaa gac tta aga ctg gag gat gca cag gac agg cac ttt							815
	Leu His Asn Lys Asp		Leu Arg Leu Glu Asp Ala		Gln Asp Arg His Phe			
			260		265		270	
55	atg ctt cag atc gcc ttg aag tgt gct gac att tgc aat cct tgt aga							863
	Met Leu Gln Ile Ala		Leu Lys Cys Ala Asp Ile		Cys Asn Pro Cys Arg			
			275		280		285	
60	atc tgg gag atg agc aag cag tgg agt gaa agg gtc tgt gaa gaa ttc							911
	Ile Trp Glu Met Ser		Lys Gln Trp Ser Glu Arg		Val Cys Glu Glu Phe			
			290		295		300	
65	tac agg caa ggt gaa ctt gaa cag aaa ttt gga ctg gaa atc agt cct							959
	Tyr Arg Gln Gly Glu		Leu Glu Gln Lys Phe Gly		Leu Glu Ile Ser Pro			
			305		310		315	
70	ctt tgt aat caa cag aaa gat tcc atc cct agt ata caa att ggt ttc							1007
	Leu Cys Asn Gln Gln		Lys Asp Ser Ile Pro Ser		Ile Gln Ile Gly Phe			
			320		325		330	335

atg agc tac atc gtg gag ccc gct ctt ccg gga atg gcc cat ttc acg 1055  
 Met Ser Tyr Ile Val Glu Pro Ala Leu Pro Gly Met Ala His Phe Thr  
 340 345 350

5

ggt aac agc acc ctg cag aga aca tgc tgg gcc acc ttc gca cac aac 1103  
 Gly Asn Ser Thr Leu Gln Arg Thr Cys Trp Ala Thr Phe Ala His Asn  
 355 360 365

10

aag ggc cag tgg aag agc ctg ttg cca agc agt aca gaa gca ggg gct 1151  
 Lys Gly Gln Trp Lys Ser Leu Leu Pro Ser Ser Thr Glu Ala Gly Ala  
 370 375 380

15

gca ttg gca gnn ggc ctt gac cac 1175  
 Ala Leu Ala Xaa Gly Leu Asp His  
 385 390

20

<210> 4  
 <211> 391  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 4  
 His Glu Arg Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Leu Leu Asn Ser Thr Thr  
 1 5 10 15

30

Tyr Ser Gly Glu Ile Gly Thr Lys Lys Lys Val Lys Arg Leu Leu Ser  
 20 25 30

35

Phe Gln Arg Tyr Phe His Ala Ser Arg Leu Leu Arg Gly Ile Ile Pro  
 35 40 45

Gln Ala Pro Leu His Leu Leu Asp Glu Asp Tyr Leu Gly Gln Ala Arg  
 50 55 60

40

His Met Leu Ser Lys Val Gly Met Trp Asp Phe Asp Ile Phe Leu Phe  
 65 70 75 80

Asp Arg Leu Thr Asn Gly Asn Ser Leu Val Thr Leu Leu Cys His Leu  
 85 90 95

45

Phe Asn Thr His Gly Leu Ile His His Phe Lys Leu Asp Met Val Thr  
 100 105 110

Leu His Arg Phe Leu Val Met Val Gln Glu Asp Tyr His Ser Gln Asn  
 115 120 125

50

Pro Tyr His Asn Ala Val His Ala Ala Asp Val Thr Gln Ala Met His  
 130 135 140

Cys Tyr Leu Lys Glu Pro Lys Leu Ala Ser Phe Leu Thr Pro Leu Asp  
 145 150 155 160

55

Ile Met Leu Gly Leu Leu Ala Ala Ala Ala His Asp Val Asp His Pro  
 165 170 175

60

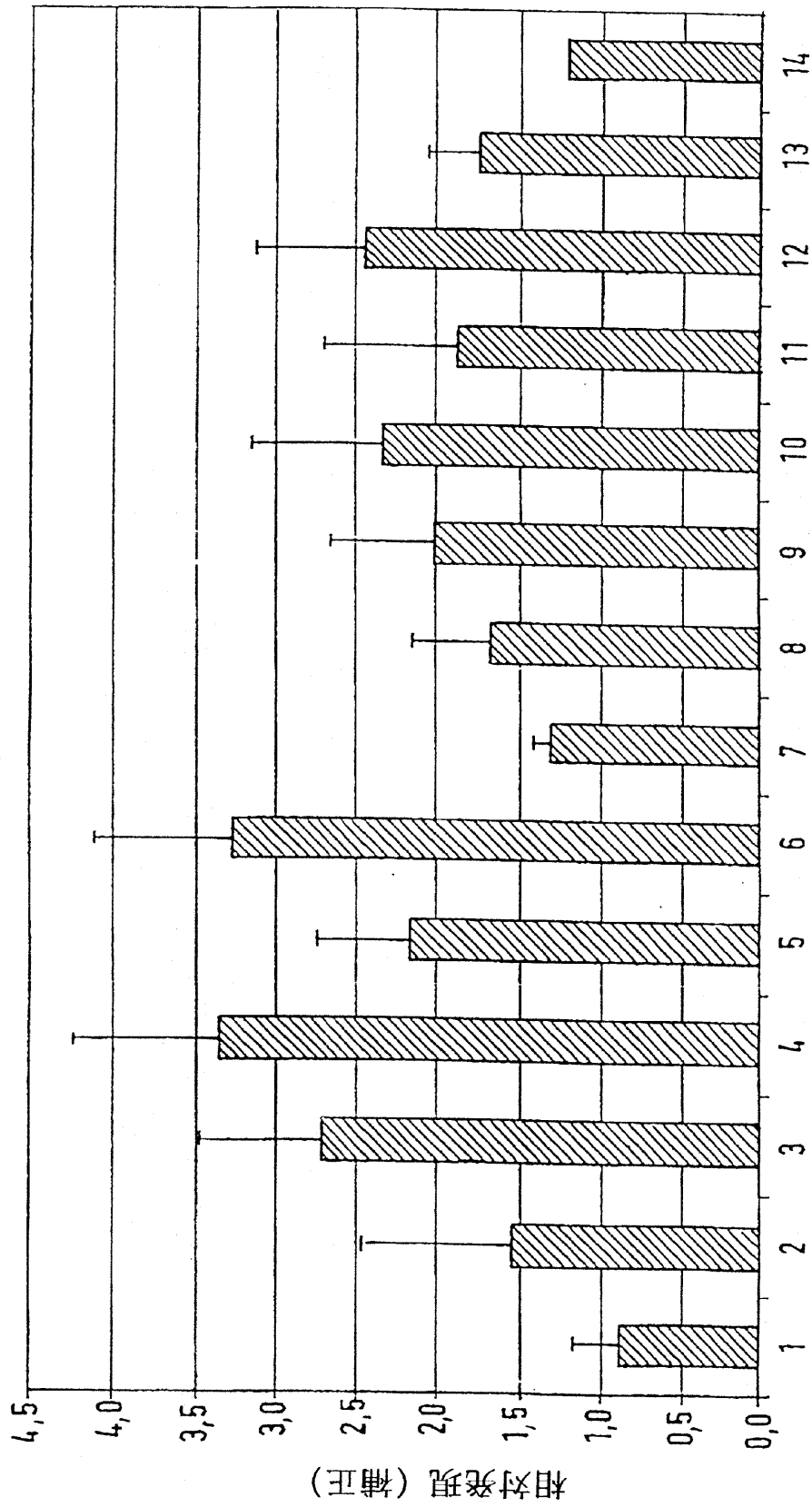
Gly Val Asn Gln Pro Phe Leu Ile Lys Thr Asn Xaa His Leu Ala Asn  
 180 185 190

Leu Tyr Gln Asn Met Ser Val Leu Glu Asn His His Trp Arg Ser Thr

	195	200	205
	Ile Gly Met Leu Arg Glu Ser Arg Leu Leu Ala His Leu Pro Lys Glu		
	210	215	220
5	Met Thr Gln Asp Ile Glu Gln Gln Leu Gly Ser Leu Ile Leu Ala Thr		
	225	230	235 240
	Asp Ile Asn Arg Gln Asn Glu Phe Leu Thr Arg Leu Lys Ala His Leu		
10		245	250 255
	His Asn Lys Asp Leu Arg Leu Glu Asp Ala Gln Asp Arg His Phe Met		
		260	265 270
15	Leu Gln Ile Ala Leu Lys Cys Ala Asp Ile Cys Asn Pro Cys Arg Ile		
	275	280	285
	Trp Glu Met Ser Lys Gln Trp Ser Glu Arg Val Cys Glu Glu Phe Tyr		
	290	295	300
20	Arg Gln Gly Glu Leu Glu Gln Lys Phe Gly Leu Glu Ile Ser Pro Leu		
	305	310	315 320
	Cys Asn Gln Gln Lys Asp Ser Ile Pro Ser Ile Gln Ile Gly Phe Met		
25		325	330 335
	Ser Tyr Ile Val Glu Pro Ala Leu Pro Gly Met Ala His Phe Thr Gly		
		340	345 350
30	Asn Ser Thr Leu Gln Arg Thr Cys Trp Ala Thr Phe Ala His Asn Lys		
	355	360	365
	Gly Gln Trp Lys Ser Leu Leu Pro Ser Ser Thr Glu Ala Gly Ala Ala		
	370	375	380
35	Leu Ala Xaa Gly Leu Asp His		
	385	390	
40			

【図1】

新規PDE7bの組織分布パターン



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PC1/EP 01/01858
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/55 C12N15/10 C12N15/62 C12N9/16 C07K16/40 C12Q1/44 G01N33/53 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HETMAN J M ET AL: "Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 97, no. 1, 4 January 2000 (2000-01-04), pages 472-476, XP002134917 ISSN: 0027-8424 the whole document ----- -/--	1,4,6-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to 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 10 August 2001		Date of mailing of the international search report 22/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Smalt, R

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 01/01858
-------------------------------------------------

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Entry/Acc.no. AL138828, 4 February 2000 (2000-02-04) COBLEY, V.: "Human DNA sequence from clone RP11-472E5 on chromosome 6. Contains ESTs and STSs. Contains the 3' part of the gene for high-affinity cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase (EC 3.1.4.17, rolipram-insensitive phosphodiesterase type 7) and a novel gene." XP002174544 * see coding sequence between 7365-90474, encoding a hypothetical PDE *</p>	1-11
P,X	<p>EP 1 018 559 A (PFIZER LTD ;PFIZER (US)) 12 July 2000 (2000-07-12) the whole document</p>	1-11
P,X	<p>SASAKI TAKASHI ET AL: "Identification of human PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 271, no. 3, 19 May 2000 (2000-05-19), pages 575-583, XP002151411 ISSN: 0006-291X the whole document</p>	1-9,11
P,X	<p>WO 00 77226 A (KAPELLER LIBERMANN ROSANA ;WHITE DAVID (US); ROBISON KEITH E (US);) 21 December 2000 (2000-12-21) the whole document</p>	1,4,6-11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/01858

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1018559 A	12-07-2000	JP 2000197494 A	18-07-2000
WO 0077226 A	21-12-2000	US 6146876 A	14-11-2000
		AU 5608000 A	02-01-2001

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	9/16	C 4 C 0 8 4
	5/10	C 1 2 Q	1/02	4 C 0 8 5
	9/16	G 0 1 N	33/15	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z 4 C 0 8 7
G 0 1 N	33/15		33/53	D 4 H 0 4 5
	33/50			M
	33/53		33/566	
	33/566	A 6 1 K	31/7084	
// A 6 1 K	31/7084		35/76	
	35/76		39/00	H
	38/00		39/395	U
	39/00	A 6 1 P	9/00	
	39/395		11/06	
A 6 1 P	9/00		29/00	
	11/06		37/02	
	29/00	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	37/02		5/00	A
	37/08	A 6 1 K	37/02	
(71)出願人	Frankfurter Str. 250, D - 64293 Darmstadt, Fed eral Republic of Ge rmany			
(72)発明者	クルクセン、 フランツ - ヴェルネル ドイツ連邦共和国 64367 ミュールタル バーンホフシュトラ-セ 39			
(72)発明者	ヘンチュ、 ベルント ドイツ連邦共和国 64289 ダルムシュタ ット カウプシュトラ-セ 48			

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13  
DA14 DA36 FB02  
4B024 AA01 AA11 BA11 CA04 HA01  
4B050 CC01 CC03 DD11 GG07 LL01  
LL03  
4B063 QA01 QA18 QQ95 QR13 QR80  
QS35  
4B065 AB01 BA02 CA31 CA44 CA46  
4C084 AA01 AA07 BA02 BA08 BA22  
CA36 CA53 DC22 ZA36 ZA59  
ZB07 ZB11 ZB13  
4C085 AA03 CC12 DD21 DD62 EE01  
4C086 EA16 ZA36 ZA59 ZB07 ZB11  
ZB13  
4C087 AA03 BB38 ZA36 ZA59 ZB07  
ZB11 ZB13  
4H045 AA11 AA30 BA09 BA41 CA40  
DA75 EA22 EA23 EA50

专利名称(译)	新型7b磷酸二酯酶		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003523748A</a>	公开(公告)日	2003-08-12
申请号	JP2001561750	申请日	2001-02-20
申请(专利权)人(译)	默克专利GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru Hafutongu		
[标]发明人	クルクセンフランツヴェルネル ヘンチュベルント		
发明人	クルクセン、フランツ-ヴェルネル ヘンチュ、ベルント		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7084 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P9/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/55 C12N15/62 C12Q1/02 C12Q1/44 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P9/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K2319/00 C12N9/16		
FI分类号	C07K16/40 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/16.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33 /50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K31/7084 A61K35/76 A61K39/00.H A61K39/395.U A61P9/00 A61P11/06 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045 /FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/HA01 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/GG07 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ95 4B063 /QR13 4B063/QR80 4B063/QS35 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA31 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA36 4C084/CA53 4C084 /DC22 4C084/ZA36 4C084/ZA59 4C084/ZB07 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C085/AA03 4C085/CC12 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/EA16 4C086/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZB07 4C086 /ZB11 4C086/ZB13 4C087/AA03 4C087/BB38 4C087/ZA36 4C087/ZA59 4C087/ZB07 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /EA22 4H045/EA23 4H045/EA50		
优先权	2000103655 2000-02-21 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了血小板衍生的生长因子D多肽和多核苷酸，以及通过重组方法生产这种多肽的方法。还公开了在诊断测定中使用血小板衍生的生长因子D多肽和多核苷酸的方法。