

(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2002 - 534116

(P2002 - 534116A)

(43)公表日 平成14年10月15日(2002.10.15)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		45/00	4 B 0 2 4
39/00		A 6 1 P 1/00	4 B 0 6 3
45/00		1/16	4 B 0 6 4
A 6 1 P 1/00		1/18	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求(全105数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 593729(P2000 - 593729)

(86)(22)出願日 平成12年1月14日(2000.1.14)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月12日(2001.7.12)

(86)国際出願番号 PCT/US00/01086

(87)国際公開番号 W000/42172

(87)国際公開日 平成12年7月20日(2000.7.20)

(31)優先権主張番号 60/183,019

(32)優先日 平成11年1月15日(1999.1.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ファーマスーティカルズ・インコーポレイテッド
 INCYTE PHARMACEUTICALS INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160

(72)発明者 ヒルマン、ジェニファー・エル
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94040・マウンテンビュー・#12・モンロードドライブ 230

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 概日リズム関連タンパク質

(57)【要約】

本発明は、概日リズム関連タンパク質(CIRYP)並びにCIRYPを同定及びコードするポリヌクレオチドを提供する。また、本発明は発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニスト及びアンタゴニストを提供する。更に、本発明はCIRYPの発現に関わる疾患の診断、治療又は予防の方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、

(a) SEQ ID NO:1及び2からなる群より選択されるアミノ酸配列、

(b) SEQ ID NO:1及び2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、

(c) SEQ ID NO:1及び2からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は

(d) SEQ ID NO:1及び2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含むことを特徴とするポリペプチド。

【請求項2】 SEQ ID NO:1及び2からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む請求項1の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 請求項1のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】 SEQ ID NO:3及び4からなる群より選択される配列を含む請求項3の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 請求項3のポリヌクレオチドに機能的に結合するプロモータ配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項5の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項7】 請求項5の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項8】 請求項1のポリペプチドを製造する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に適した条件の下で細胞を培養する過程であって、該細胞は、請求項1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合するプロモータ配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換される、培養過程と、

(b) そのように発現したポリペプチドを回収する過程とを含むことを特徴とするポリペプチドの製造方法。

【請求項9】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗

体。

【請求項10】 単離されたポリヌクレオチドであって、

(a) SEQ ID NO:3及び4からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列、

(b) SEQ ID NO:3及び4からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列、

(c) (a)に対して相補的なポリヌクレオチド配列、又は

(d) (b)に対して相補的なポリヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項11】 請求項10のポリヌクレオチドの少なくとも60個の連続的なヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 請求項10のポリヌクレオチド配列を含むサンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出するための方法であって、

(a) 前記サンプルを、前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに対して相補的な配列を含む少なくとも16個の連続的なヌクレオチドを含むプローブとハイブリダイズさせる過程であって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドとの間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件の下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、ハイブリダイズ過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体が存在するか否かを検出する過程であって、存在する場合には随意にその量を検出する、検出過程とを含むことを特徴とする検出方法。

【請求項13】 前記プローブは、少なくとも30個の連続的なヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記プローブは、少なくとも60個の連続的なヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項15】 有効な量の請求項1のポリペプチド及び薬理的に許容される賦形剤を含む医薬品組成物。

【請求項16】 機能的CIRYPの発現の低下に関連する疾病若しくは症状の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に対して請求項15の医薬品

組成物を投与する過程を含む方法。

【請求項17】 請求項1のポリペプチドのアゴニストとして有効な化合物をスクリーニングするための方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

(b) 前記サンプルにおけるアゴニストの活性を検出する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項18】 請求項17の方法によって同定されたアゴニスト化合物及び薬理的に許容される賦形剤を含む医薬品組成物。

【請求項19】 機能的CIRYPの発現の低下に関連する疾病若しくは症状の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に対して請求項18の医薬品組成物を投与する過程を含む方法。

【請求項20】 請求項1のポリペプチドのアンタゴニストとして有効な化合物をスクリーニングするための方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

(b) 前記サンプルにおけるアンタゴニストの活性を検出する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項20の方法によって同定されたアンタゴニスト化合物及び薬理的に許容される賦形剤を含む医薬品組成物。

【請求項22】 機能的CIRYPの過剰発現に関連する疾病若しくは症状の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に対して請求項21の医薬品組成物を投与する過程を含む方法。

【請求項23】 請求項4の配列を含む標的ポリペプチドの発現を変化させるのに有効な化合物をスクリーニングするための方法であって、

(a) 前記標的ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

(b) 前記標的ポリペプチドの発現の変化を検出する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****技術分野**

本発明は、概日リズムに関連するタンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列、並びに生殖障害、胃腸障害、神経障害及び発生障害の診断、治療及び予防におけるこれらの配列の利用法に関するものである。

【0002】**発明の背景**

生物リズムの確立をもたらす脳に対する最も重要な外部のキュー(cue)は光である。哺乳動物は、昼行性又は夜光性の何れかの傾向にあり、それらの休息及び活動の周期は、夜明け及び日没に相当する境界に従って分けられる。昼夜の支配的なサイクルは、概日リズムと称される。生物学的プロセスの概日リズム性は、全ての真核生物及び幾つかの原核生物の基本的な特性である。これらのリズムは、内部の時間維持システムによって調節される。外部環境の変化、特に明-暗サイクルの変化によって、この生物学的な時計が調整される。告時因子(time cue)のない一定の環境条件で、その時計によって調節されるリズムは概ね24時間の周期を示す。哺乳動物は、感覚が遮断された環境に置かれた場合には、概ね24時間の周期のリズムを示すが、それらは種によって異なり、より大きな周期或いはより小さな周期となる。例えば、ヒトは、通常の24時間の周期よりも平均して1時間長いリズムを示す。通常の告時因子から所定の期間隔離した後には、殆どのヒトには25時間の休息及び活動の周期が定着する。しかし、幾つかの種属では、通常のリズムの2倍の48~50時間に移行する。通常の告時因子から隔離することによって、物理的健康及び精神衛生にストレスが与えられ得る。ヒトの場合には、24時間付近に集中する覚醒と睡眠の通常のリズムが、物理的及び精神衛生及び心理学的健康に安定化作用をもたらすと考えられる。このリズムの混乱によって、結果として異なる身体リズムが生じ、通常と同調性から外れて新たなパターンをとり得る (Reviewed in Restak, R.M. (1984) The Brain, Bantam Books, New York NY, pp. 101-111)。

【0003】

視床下部の視交叉上核 (SCN) には、全てではないとしても哺乳動物の殆どのリズムを調節する支配的な概日時計が含まれる。その名称は、視交叉の直上のSCNの位置に由来する。SCNは、眼から明暗についての情報を受取るが、自ら専用の神経経路、網膜視床下部路 (RHT) を有し、それらは脳に視覚的な情報を伝達する主要な神経束と区別される。実験動物において脳の外科的なピンポイントの損傷によってSCNを破壊した場合、睡眠と覚醒のリズム並びに多くの他のリズムが消失する。興味深いことに、SCNを欠いた動物は、各24時間において総量では同じだけ走り回り、摂食するが、これらの活動は、昼夜問わず不規則に分布している。松果体の主要なホルモンであるメラトニンによって、哺乳動物の概日リズムが変化し得る。メラトニンの概日性の効果は、SCNにおけるメラトニン受容体によって媒介されると考えられる。

【0004】

一般に、概日リズム調節性の遺伝子発現の特性及びその程度については未知の部分が多い。Drosophila melanogasterの場合は、概日ペースメーカーの必須の構成要素、period (per) 遺伝子のみが律動的mRNA発現を示すことが知られている。D. melanogasterにおける遺伝子発現の日周期性の制御の評価によって、D. melanogaster律動的発現遺伝子2 (Deg-2) のような日周期性の発現の周期に依存する遺伝子が同定されている。或るmRNAは、朝方に最大の発現を示すことが知られており、一方で別のmRNAは、夕方に最も大量に発現されることが知られている。「朝型」cDNAの各々は、明暗サイクルの存在、時間が定められた摂食、並びに周期的変動に対するper遺伝子の機能に独特の依存性を示すことが知られている。従って、遺伝子発現の日周性の制御は、特徴付けされていない多くの遺伝子を含むハエの頭部における重要な現象である。概日性発現遺伝子のサブセットは、主としてそれらの律動的発現の周期に依存する (Van Gelder, R.N. et al. (1995) *Curr. Biol.* 5:1424-1436)。生物学的タイミングに關与する別の興味深い分子として、clk-1遺伝子の産物、187個の残基のCLK-1タンパク質が挙げられる。線虫Caenorhabditis elegansにおけるclk-1の活性によって、その虫の発達の速度、行動の速度及び死ぬ時期が調節される。C. elegans clk-1変異体では、その生理学的プロセスのタイミングの調節は解除され、これは、その虫の一生を通じて

時間が定められたプロセスに影響を及ぼすタイミングメカニズムの存在を示唆している。CLK-1は、線虫、げっ歯類及びヒトの間で高度に保存されていることが知られており、また、それは酵母菌の代謝性制御因子COQ7と構造的に類似している。clk-1遺伝子のヒト、ラット及びマウスホモログは、177個の残基にわたって33%の同一性を示す。そのラットとヒトの配列の間の同一性のレベルは、酵母菌からヒトまでのclk-1の機能的保存の考えを強力に支持するものである。更に、CLK-1ホモログの配列を分割及びアライメントし、幾つかの保存された疎水性残基を伴う直列型反復コア (TRC) の82の残基ドメインの存在を明らかにすることが可能である (Ewbank, J.J. et al. (1997) Science 275:980-983)。

【0005】

季節性情動障害 (SAD) は、重症度(severity)の異なる症状の発現を伴う再発性の抑うつ障害或いは双極性障害の一形態である。多くの場合、季節性情動障害 (SAD) を患う患者は、彼らの概日時計のリセットに異常がある。季節性情動障害の最も良く知られた形態である「冬季性うつ病(winter depression)」は、秋から始まり冬季を通して続くうつ病、過眠症、炭水化物の欲求及び体重増加の再発によって特徴づけられる。SADについての現在の研究は、メラトニンがCNSにおけるヒトの概日システムの主要な媒介物であることを仮定し、網膜欠失、内部の概日リズムの相障害(phase-disturbance)及び神経内分泌学的発現障害(neuroendocrinologically expressed disorders)等の領域を網羅している。また、セロトニンのような神経伝達物質の異常は、SADと関連付けられてきた。うつ病の治療を受ける患者の間では、SADの有病率はより一層高い (Gysin, F. et al. (1997) Acta. Med. Port. 10:887-893)。

【0006】

新規な概日リズムに関連するタンパク質及びそれらをコードするポリヌクレオチドの開示は、生殖障害、胃腸障害、神経障害及び発生障害の診断、予防及び治療に役立つ新たな組成物を提供して当業者の要求を満たすものである。

【0007】

発明の概要

本発明は、まとめて「CIRYP」、個別には「CIRYP-1」及び「CIRYP-2」と称される精

製されたポリペプチドである概日リズム関連タンパク質を特徴とする。一実施態様において、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されたアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は(d) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0008】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されたアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は(d) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、そのポリヌクレオチドはSEQ ID NO:3-4からなる群より選択される。

【0009】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されたアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は(d) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して機能的に結合したプロモータ配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。別法では、本発明は、組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。また別法では、本発明は、組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

【0010】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されたアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-2

からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は(d) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含むポリペプチドを製造するための方法を提供する。その方法には、(a)ポリペプチドの発現に適した条件の下で細胞を培養する過程であって、その細胞が、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモータ配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換されるような培養過程、及び(b)そのように発現したポリペプチドを回収する過程が含まれる。

【0011】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されたアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は(d) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含むポリペプチドに対して特異的に結合する単離された抗体を提供する。

【0012】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:3-4からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列、(b) SEQ ID NO:3-4からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列、(c) (a)に対して相補的なポリヌクレオチド配列、又は(d) (b)に対して相補的なポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、そのポリヌクレオチドには、少なくとも60個の連続的なヌクレオチドが含まれる。

【0013】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:3-4からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列、(b) SEQ ID NO:3-4からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列に対して少なくとも70%の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列、(c) (a)に対して相補的なポリヌクレオチド配列、又は(d) (b)に対して相補的なポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの配列を含む、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出するための方法を提供する。その方法

には、(a) サンプルを、サンプル中の標的ポリヌクレオチドに対して相補的な配列を含む少なくとも16個の連続的なヌクレオチドを含むプローブとハイブリダイズさせる過程であって、そのプローブと標的ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件の下で、そのプローブが標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするようなハイブリダイズ過程、及び(b) そのハイブリダイゼーション複合体が存在するか否かを検出する過程であって、存在する場合には随意にその量を検出するような検出過程が含まれる。別法では、そのプローブには少なくとも30個の連続的なヌクレオチドが含まれる。また別法では、そのプローブには少なくとも60個の連続的なヌクレオチドが含まれる。

【0014】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されたアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は(d) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含む有効な量のポリペプチドと、薬理的に許容される賦形剤とを含む医薬品組成物を提供する。更に、本発明は、機能的CIRYPの発現の低下に関連する疾病若しくは症状の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に対してその医薬品組成物を投与する過程を含む方法を提供する。

【0015】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されたアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は(d) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含むポリペプチドのアゴニストとしての有効性について化合物をスクリーニングするための方法を提供する。その方法には、(a) ポリペプチドを含むサンプルを化合物に対して曝露する過程、及び(b) サンプルにおけるアゴニストの活性を検出する過程が含まれる。別法として、本発明は、その方法によって同定されたアゴ

ニスト化合物及び薬理的に許容される賦形剤を含む医薬品組成物を提供する。また別法として、本発明は、機能的CIRYPの発現の低下に関連する疾病若しくは症状の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に対してその医薬品組成物を投与する過程を提供する。

【0016】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されたアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の生物学的に活性な断片、又は(d) SEQ ID NO:1-2からなる群より選択されるアミノ酸配列の免疫原性の断片を含むポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性について化合物をスクリーニングするための方法を提供する。その方法には、(a) ポリペプチドを含むサンプルを化合物に対して曝露する過程、及び(b) サンプルにおけるアンタゴニストの活性を検出する過程が含まれる。別法として、本発明は、その方法によって同定されたアンタゴニスト化合物及び薬理的に許容される賦形剤を含む医薬品組成物を提供する。また別法として、本発明は、機能的CIRYPの過剰発現に関連する疾病若しくは症状の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に対してその医薬品組成物を投与する過程を提供する。

【0017】

更に、本発明は、SEQ ID NO:3-4からなる群より選択される配列を含む標的ポリペプチドの発現の変更における有効性について化合物をスクリーニングするための方法を提供し、その方法には、(a) 標的ポリペプチドを含むサンプルを化合物に対して曝露する過程、及び(b) 標的ポリペプチドの発現の変化を検出する過程が含まれる。

【0018】

発明を実施するための形態

本発明のタンパク質、核酸配列、及び方法について説明する前に、本発明は、ここに開示した特定の装置、材料、及び方法に限定されるものではなく、その実施形態は変更可能であることを理解されたい。また、ここで使用した専門用語は

、特定の実施例のみを説明する目的で用いたものであり、特許請求の範囲のみで限定される本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも理解されたい。

【0019】

請求の範囲を含む本明細書において、単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、文脈からそうでないことが明らかである場合以外は、複数の意味も含むことに注意されたい。従って、例えば「或る宿主細胞」の表記には、複数のそのような宿主細胞が含まれ、この「抗体」の表記は、1又はそれ以上の抗体及び当業者に周知のその等価物なども表している。

【0020】

特別に定義されていない限り、本明細書における全ての専門用語及び特定の用語は、本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。ここで説明したものと類似あるいは等価な方法、装置及び材料を本発明の実施や試験において使用可能であるが、本明細書においては好適な方法、装置及び材料を説明する。本発明で言及した全ての文献は、文献で報告された本発明に関して用いられ得る細胞株、プロトコル、試薬及びベクターを説明及び開示するために引用したものである。本明細書のあらゆる開示内容は、本発明が従来発明によるそのような開示に先行し得ないことを認めるものと解釈してはならない。

【0021】

定義

用語「CIRYP」は、任意の種、特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ、及びヒトを含む哺乳類の種から得られたものであって、天然、合成、半合成か、或いは組換え体などの任意の出所から得られた実質的に精製されたCIRYPのアミノ酸配列を指す。

【0022】

用語「アゴニスト」は、CIRYPの生物学的活性を強化したり、模擬する分子を指す。このアゴニストには、タンパク質、核酸、糖質、小分子又は他の任意の化合物や組成物が含まれ、それらはCIRYPと直接相互作用するか、或いはCIRYPが関

与する生物学的経路の成分に作用することによってCIRYPの活性を調節する。

【0023】

用語「アレル変異配列」は、CIRYPをコードする遺伝子の別の形を指す。アレル変異配列は、核酸配列における少なくとも1つの突然変異に起因し、変異したmRNA或いはポリペプチドが生ずるが、それらの構造又は機能は変化する場合と変化しない場合とがある。遺伝子には、天然の形態のアレル変異配列がないもの、1つ存在するもの、或いは多数存在するものがある。一般にアレル変異配列が生じる通常の変異は、ヌクレオチドの自然な欠失、付加又は置換によるものである。これらの変化の形態の各々は、単独又は他の変化と組み合わせられて、所定の配列において1又はそれ以上の回数で生じ得る。

【0024】

ここで用いるCIRYPをコードする「変異(altered)」核酸配列には、結果として同一のCIRYP又はCIRYPの機能的特徴の少なくとも1つを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをもたらす種々のヌクレオチドの欠失、挿入又は置換をともなうそれらの配列が含まれる。この定義には、CIRYPをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の位置とは異なる位置のアレル変異配列に対する不適切な或いは予期しないハイブリダイゼーションや、CIRYPをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な、或いは検出困難な多型が含まれる。コードされたタンパク質もまた「変異」したものであり得て、サイレント変化(silent change)をもたらして結果的に機能的に等価のCIRYPとなるアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、CIRYPの生物学的又は免疫学的活性が保持される限りにおいて、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性及び/又は両親媒性の性質についての類似性に基づき行なわれ得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンが含まれる。類似の親水性値を有する非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン及びバリン；グリシン及びアラニン；並びにフェニルアラニン及びチロシンが含まれる。

【0025】

用語「アミノ酸」又は「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質の配列又はそれらの何れかの断片であり、天然や合成の分子を指す。「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すのに用いられる場合は、「アミノ酸配列」及び類似の用語は、そのアミノ酸配列を、記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0026】

用語「増幅」は、核酸配列の更なる複製物を生成することであり、通常は当業者に周知のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を用いて実施される。

【0027】

用語「アンタゴニスト」は、CIRYPの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストには、抗体、核酸、糖質、小分子又は他の任意の化合物や組成物などのタンパク質が含まれ、それらはCIRYPと直接相互作用するか、或いはCIRYPが関与する生物学的経路の成分と作用することによってCIRYPの活性を調節する。

【0028】

用語「抗体」は、完全な分子や、抗原決定基と結合し得る F_a 、 $F(ab')_2$ 、及び F_v フラグメントのようなそれらの断片を指す。CIRYPポリペプチドに結合する抗体は、未処置のポリペプチドを用いて、或いは免疫化する抗原として関与する小型のペプチドを含むその断片を用いて調製することができる。動物（例えば、マウス、ラット又はウサギ）を免疫化するのに用いるポリペプチド又はオリゴペプチドは、RNAの翻訳又は化学的に合成されたものから得られ、必要ならば担体タンパク質と結合可能である。ペプチドと化学的に結合する通常用いられる担体には、ウシ血清アルブミン及びサイログロブリン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）が含まれる。次に、この結合したペプチドを用いて動物を免疫化する。

【0029】

用語「抗原決定基」は、特定の抗体と接触する分子の領域（即ち、エピトープ）を指す。タンパク質若しくはタンパク質の断片を用いて宿主の動物を免疫化する。

る場合、このタンパク質の多くの領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域又は3次元構造）と特異的に結合する抗体の産生を誘発し得る。抗原決定基は、抗体への結合に関して元の抗原（即ち、免疫応答を誘発するために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0030】

用語「アンチセンス」は、特定の核酸配列の「センス」鎖と相補的な核酸配列を含む任意の成分を指す。アンチセンス分子は、合成や転写を含む任意の方法で生成することができる。この相補的ヌクレオチドは、一度細胞内に導入されると、細胞によって作られた天然の配列と結合して2重鎖を形成し、転写や翻訳を妨げる。「ネガティブ」若しくは「マイナス（-）」なる表現がアンチセンス鎖を指し、「ポジティブ」若しくは「プラス（+）」なる表現がセンス鎖を指すことがある。

【0031】

用語「生物学的に活性」は、天然の分子の構造的機能、調節機能又は生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に「免疫学的に活性」は、適切な動物や細胞において特定の免疫反応を誘発し、特定の抗体と結合するための、天然のCIRYP、組換え体のCIRYP若しくは合成のCIRYP又はその任意のオリゴペプチドの能力を指す。

【0032】

用語「相補的」又は「相補性」は、塩基対によるポリヌクレオチド同士の自然な結合を指す。例えば、配列「5'A-G-T3'」は相補的配列「3'T-C-A5'」に結合する。2つの1本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸のみが結合しているような「部分的」なものや、或いは1本鎖分子間に完全な相補性が存在するような「完全」なものもある。核酸鎖同士の相補性の程度は、核酸鎖同士のハイブリダイゼーションの効率及び強度に大きな影響を与える。このことは、核酸鎖同士の結合によって左右される増幅反応や、ペプチド核酸（PNA）分子の設計及び使用において特に重要である。

【0033】

用語「所定のポリヌクレオチド配列を含む組成物」及び「所定のアミノ酸配列

を含む組成物」とは、概して所定のポリヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を含む任意の組成物を指す。この組成物には、乾燥した製剤又は水溶液が含まれ得る。CIRYP若しくはCIRYPの断片をコードするポリヌクレオチドを含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして利用できる。このプローブは凍結乾燥した状態で保存することができ、糖質のような安定化剤と結合させることができる。ハイブリダイゼーションにおいて、このプローブを、塩（例えば、NaCl）、界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)）及び他の物質（例えば、デンハート液、乾燥ミルク、サケ精子DNA等）を含む水溶液に分散させることができる。

【0034】

用語「コンセンサス配列」は、再度配列決定して不要な塩基を分離した核酸配列か、XL-PCR kit(The Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT)を用いて5'方向及び/又は3'方向に伸長して再度配列決定した核酸配列か、或いは断片の組み立てのためのコンピュータプログラム（例えば、GELVIEW Fragment Assembly system, GCG, Madison WI）を用いて、2種以上のインサイトクローンや、また場合によっては1又はそれ以上の公有のESTの重複した配列から組み立てられた核酸配列である。いくつかの配列が伸長され且つ組み合わされてコンセンサス配列が作られる。

【0035】

用語「保存的なアミノ酸置換」は、元のタンパク質の特性を殆ど損なわない置換を指し、つまり、その置換によってそのタンパク質の構造や、ことに機能は大きくは変化せずに保存される。以下に、タンパク質の元のアミノ酸が別のアミノ酸に置換される保存的なアミノ酸置換を示す。

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Set
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser

Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

一般に、保存的なアミノ酸置換では、(a)置換領域のポリペプチドの主鎖構造、例えば、シートやヘリックス高次構造、(b)置換部位の分子の電荷若しくは疎水性並びに/又は(c)側鎖の大部分が維持される。

【0036】

用語「欠失」は、結果的に1個又はそれ以上のヌクレオチド若しくはアミノ酸残基が欠けるようなヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の変化を指す。

【0037】

用語「誘導体」は、化学的に修飾されたポリペプチド配列若しくはポリヌクレオチド配列を指す。ポリヌクレオチド配列の化学修飾には、例えば、水素からアルキル基、アシル基、ヒドロキシル基又はアミノ基への置換が含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然の分子の生物学的又は免疫学的機能を保持するポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化(pegylation)、又は元のポリペプチドの生物学的若しくは免疫学的機能を保持する別の任意のプロセスで修飾されたものである。

【0038】

用語「断片」は、CIRYP若しくはCIRYPをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列(parent sequence)と同一であるがより長さの短い配列を指す。「断片」には、所定の配列の長さから1つのヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さのものまでが含まれ得る。例えば、或る断片には、5~100個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基が含まれ得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子又はその他の目的に用いる断片は、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さであり得る。断片は、分子の特定の領域から優先的に選択されることもある。例えば、ポリペプチド断片には、所定の配列に示すような最初の250若しくは500個のアミノ酸(又は、ポリペプチドの最初の25%又は50%)から選択された連続する所定の長さのアミノ酸が含まれ得る。これらの長さは例示的なものであり、本発明の実施例には、配列表、表及び図面を含めた明細書に記載された任意の長さが含まれ得る。

【0039】

SEQ ID NO:3-4の或る断片には、例えば同一のゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:3-4を特異的に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域が含まれる。SEQ ID NO:3-4の或る断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術や、SEQ ID NO:3-4を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法において有用である。或る断片と一致するSEQ ID NO:3-4の断片やSEQ ID NO:3-4の領域の正確な長さは、その断片の目的に基づいて周知技術によってルーチン的に決定可能である。

【0040】

SEQ ID NO:1-2の或る断片は、SEQ ID NO:3-4の或る断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-2の或る断片には、SEQ ID NO:1-2を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域が含まれる。例えば、SEQ ID NO:1-2の或る断片は、SEQ ID NO:1-2を特異的に認識する抗体の産生のための免疫原性ペプチドとして有用である。或る断片と一致するSEQ ID NO:1-2の断片やSEQ ID NO:1-2の領域の正確な長さは、その断片の目的に基づいて周知技術によってルーチン的に決定可能である。

【0041】

用語「類似性」は、或る程度の相補性を意味する。類似性には、部分的な類似性と、完全な類似性がある。用語「類似性」の代わりに「同一性」が用いられ得る。同一の配列が標的の核酸とハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害する部分的に相補的な配列を「実質的に類似」と称する。完全に相補的な配列と標的配列とのハイブリダイゼーションの阻害は、緩やかな厳密性の条件下で、ハイブリダイゼーションアッセイ（サザンブロット、ノーザンブロット又は溶液ハイブリダイゼーション等）を用いて検定可能である。実質的に類似な配列又はハイブリダイゼーションプローブは、緩やかなストリンジェントな条件下で、標的配列に対する完全に類似（同一）な配列の結合について競合してそれを阻害し得る。これは、緩やかなストリンジェントな条件では、非特異的な結合が許容されるということの意味するものではなく、緩やかなストリンジェントな条件では、2つの配列の相互の結合が特異的（即ち、選択的）な相互作用であることが必要である。非特異的な結合が存在しないことを、部分的な相補性さえも有していない（即ち、約30%未満の類似性又は同一性）第2の標的配列を用いることにより検査することができる。非特異的な結合が存在しない場合には、実質的に類似な配列又はプローブは第2の非相補的な標的配列とハイブリダイズしない。

【0042】

ポリヌクレオチド配列についての用語「同一性のパーセント」又は「同一性の%」とは、標準的なアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つ以上のポリヌクレオチド配列間の残基の一致の百分率を意味する。このようなアルゴリズムでは、2つの配列間のアラインメントを最適化するために、標準的な再現性のある方法で、比較される配列にギャップを挿入して2つの配列間のより有意な比較を行うことができる。

【0043】

ポリヌクレオチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定可能である。このプログラムはLASERGENEソフトウェアパッケージの一部であり、分子生物学分析プログラム一式（DNASTAR, Madison WI）である。このCLUSTAL Vについては、Higgins, D.G. 及び P.M. Sharp (198

9) CABIOS 5:151-153並びにHiggins, D.G. ら (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対のアライメントの場合、デフォルトパラメーターは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4及び「diagonals saved」=4と設定する。「重みづけされた」残基重みづけ表がデフォルトとして選択される。CLUSTAL Vによって、同一性のパーセントは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列の対の間の「類似性のパーセント」として報告される。

【0044】

或いは、一般的に用いられる無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式は、NCBI、Bethesda、MD、及びインターネット (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) などを含めた幾つかのソースから入手できるNational Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. ら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410) によって提供される。BLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と種々のデータベースからの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いられる「blastn」を含めた様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と称されるツールが入手可能であり、2つのヌクレオチド配列の対を直接比較するために用いる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html> にアクセスして対話形式で利用可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp (後述) の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、デフォルト設定に設定されたギャップ及び他のパラメーターと共に用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するとき、デフォルトのパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999) をblastnと共に使用できる。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようなものであり得る。

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で定められる配列の全長に対して測定するか、或いはより短い長さの配列、例えば、より大きな所定の配列から得られた断片（例えば、少なくとも、20、30、40、50、70、100又は200個の連続するヌクレオチドの断片）の長さに対して測定してもよい。このような長さは単に例示的なものであり、配列表、表及び図面を含めた明細書に記載の配列の任意の長さの断片を用いて、同一性のパーセントが測定され得る長さを示すことができることを理解されたい。

【0045】

高い同一性を示さない核酸配列にも関わらず、遺伝子コードの縮重のために類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。縮重を利用して核酸配列を変化させて、それらが全て実質的に同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を作り出すことができる。

【0046】

ポリペプチド配列についての用語「同一性のパーセント」又は「同一性の%」とは、標準的なアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つ以上のポリペプチド配列間の残基の一致の百分率を意味する。ポリペプチド配列アラインメントの方法は周知である。アラインメント方法の中には、保存的なアミノ酸置換を考慮するものもある。先に詳述したこのような保存的な置換では、通常は置換部位の酸性度や疎水性が保存され、ポリペプチドの構造が（従って機能も）保存される。

【0047】

ポリペプチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN バージョン3.12e配列アラインメントプログラム（前述）に組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定可能である。CLUSTAL Vを用いるポリペプチド配列の対のアライメントの場合、デフォルトのパラメーターは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5及び「diagonals saved」=5と設定する。PAM250マトリクス

が、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の間の同一性のパーセントは、「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0048】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式が用いられ得る。例えば、2つのポリペプチド配列の対の比較をする場合、デフォルトのパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)をblastpと共に使用できる。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようなものであり得る。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で定められるポリペプチド配列の全長に対して測定するか、或いはより短い長さの配列、例えば、より大きな所定のポリペプチド配列から得られた断片（例えば、少なくとも、15、20、30、40、50、70又は150個の連続する残基の断片）の長さに対して測定してもよい。このような長さは単に例示的なものであり、配列表、表及び図面を含めた明細書に記載の配列の任意の長さの断片を用いて、同一性のパーセントが測定され得る長さを示すことができることを理解されたい。

【0049】

「ヒト人工染色体」(HAC)は、6kb~10MbのサイズのDNA配列を含み、且つ安定した有糸分裂染色体の分離及び維持に必要な全ての要素を含む直鎖状の小染色体である。

【0050】

用語「ヒト化抗体」は、抗体が本来の結合能力をそのまま保持しながらヒト抗体により近づくように、非抗体結合領域におけるアミノ酸配列を変化させた抗体分子を指す。

【0051】

用語「ハイブリダイゼーション」は、所定のハイブリダイゼーション条件の下で或る1本鎖ポリヌクレオチドが相補的な鎖と塩基対を形成することによるアニーリングプロセスを指す。特異的なハイブリダイゼーションとは、2つの核酸配列が高度な同一性を有することを意味する。特異的なハイブリダイゼーション複合体はアニーリングが許容される条件の下で形成され、「洗浄過程」の後もハイブリダイズしたままである。洗浄過程は、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーの決定において特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異的な結合（即ち、完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が減少する。核酸配列間のアニーリングが許容される条件は、当業者によってルーチ的に決定され、ハイブリダイゼーション実験の間は一定であるが、一方で、所望のストリンジェンシーのために実験中に洗浄条件を変更可能であり、従ってハイブリダイゼーション特異性が得られる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度68℃で、約6×SSC、約1%（w/v）のSDS及び約100 µg/mlの変性サケ精子DNAの存在下で成立する。

【0052】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの一部は、洗浄過程を行う温度で表すことができる。通常、この洗浄温度は、所定のイオン強度とpHにおける特定の配列の融点（ T_m ）よりも約5～20℃低く選択される。この T_m は、（所定のイオン強度とpHの下で）標的の配列の50%が、完全に一致するプローブとハイブリダイズする温度である。 T_m を算出するための式及び核酸のハイブリダイゼーションの条件は周知であり、Sambrookらの文献（1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版の1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; 特に2巻の9章を参照）に記載されている。

【0053】

本発明のポリヌクレオチド間のハイブリダイゼーションの高いストリンジェンシーの条件には、約0.2×SSC及び約1%のSDSの存在下の約68℃での1時間の洗浄過程が含まれる。或いは、65℃、60℃、55℃又は42℃の温度で行う。SSCの濃度は、約0.1%のSDSの存在下で、約0.1～2×SSCの範囲を変化し得る。通常は、遮断剤

を用いて非特異的なハイブリダイゼーションを阻止する。このような遮断剤には、例えば、約100~200 µg/mlの変性サケ精子DNAが含まれる。約35~50%v/vの濃度のホルムアミドなどの有機溶剤を、例えば、RNAとDNAのハイブリダイゼーションなどの特定の場合に用いることができる。これらの洗浄条件の有用な変更については、当業者には容易に明白であろう。特に高度なストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、それらのヌクレオチド及びコードされたポリペプチドに対して類似の役割を強く示唆している。

【0054】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基の間の水素結合形成の力によって、2つの核酸配列間で形成された複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶液中で形成されるか（例えば、C₀t又はR₀t解析）、或いは溶液中に存在する一方の核酸と固体支持体（例えば、紙、メンブラン、フィルタ、ピン若しくはガラススライド、又は細胞若しくはその核酸が固定される他の適切な基板）に固定されたもう一方の核酸との間で形成され得る。

【0055】

用語「挿入」或いは「付加」は、1又は2個以上のヌクレオチド若しくはアミノ酸残基をそれぞれ付加するようなヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の変化を指す。

【0056】

用語「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症又は伝染性若しくは遺伝性の疾患に関連する症状を指す。これらの症状は、細胞及び全身の防御系に作用する種々の因子（例えば、サイトカイン、ケモカイン及び他のシグナル伝達分子）の発現によって特徴づけられる。

【0057】

用語「マイクロアレイ」は、基板上の種々のポリヌクレオチドの配置を指す。

【0058】

マイクロアレイの文脈における用語「エレメント」又は「アレイエレメント」は、基板の表面に配置されたハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドを指す。

【0059】

用語「調節(modulate)」は、CIRYPの活性の変化を指す。例えば、調節によって、タンパク質活性、結合特性、又はCIRYPの他の任意の生物学的特性、機能的特性若しくは免疫学的特性の増大や低下をもたらされる。

【0060】

用語「核酸」又は「核酸配列」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド又はそれらの任意の断片を指す。また、これらの用語は、1本鎖若しくは2本鎖の、センス鎖若しくはアンチセンス鎖のゲノム起源又は合成起源のDNA若しくはRNAや、ペプチド核酸(PNA)や、任意のDNA様若しくはRNA様物質も指す。

【0061】

用語「機能的に結合(する)」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写又は発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。一般に、同じ読み枠内で2つのタンパク質をコードする領域が結合する必要がある場合は、機能的に結合したDNA配列は非常に近接するか、或いは連続し得る。

【0062】

用語「ペプチド核酸」(PNA)は、リジンを末端とするアミノ酸残基のペプチドバックボーンに結合した少なくともヌクレオチド5個以上の長さのオリゴヌクレオチドを含むアンチセンス分子又は抗遺伝子剤(anti-gene agent)を指す。末端のリジンがその組成に溶解性を賦与している。PNAは相補的な1本鎖DNAやRNAに優先的に結合して転写物の伸長を止め、またPNAをポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延ばすことが可能である。

【0063】

「プローブ」とは、CIRYP、それらの相補配列又はそれらの断片をコードする核酸配列のことであり、それらを同一の核酸配列、アレル核酸配列又は関連する核酸配列の検出に用いる。プローブは、検出可能な標識又はレポーター分子に結合した単離されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドである。典型的な標識

には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬及び酵素が含まれる。「プライマー」は、短い核酸（通常はDNAオリゴヌクレオチド）であり、それらは、相補的な塩基対を形成することで標的のポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。次に、プライマーは、DNAポリメラーゼ酵素によって標的のDNA鎖に沿って延長され得る。プライマーの組は、例えば、PCR法による核酸配列の増幅（及び同定）に用いること可能である。

【0064】

本発明に用いるプローブ及びプライマーは、通常は既知の配列の少なくとも15の連続するヌクレオチドを含む。特異性を高めるために、より長いプローブ及びプライマーが用いることが可能であり、そのようなプローブ及びプライマーには、例えば、開示した核酸配列の連続する少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100又は150のヌクレオチドが含まれる。プローブ及びプライマーは、これらの例よりも相当長い場合もあり、表、図面及び配列表を含めた本明細書に示された任意の長さのヌクレオチドも用いることができることを理解されたい。

【0065】

プローブ及びプライマーの準備及び使用方法については、例えば、Sambrook, J.らによる、1989年、名称「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版の1-3巻（Cold Spring Harbor Press, Plainview NY）、又はAusubel, F.M.らによる、1987年、名称「Current Protocols in Molecular Biology」（Greene Pubi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY）、並びに Innisらによる、1990年、名称「PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications」（Academic Press, San Diego CA）を参照されたい。PCR用のプライマーの組は、例えば、Primer（Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA）のような目的のためのコンピュータプログラムを用いて既知の配列から得ることができる。

【0066】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、当分野で周知のプライマー選択用のコンピュータプログラムで選択される。例えば、OLIGO 4.06ソフトウェアは、各々が最大100個のヌクレオチドまでのPCR用のプライマーの対の選択や、32

キロベースまでの入力ポリヌクレオチド配列からの最大5,000個のヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチド及びより大きなポリヌクレオチドの分析に有用である。類似のプライマー選択用プログラムには、能力を拡張する更なる機能が組み込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム (Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TXより入手可能) は、メガベースの配列から特定のプライマーを選択可能であり、ゲノムワイドスコープ (genome-wide scope) におけるプライマーの設計に有用である。Primer3プライマー選択プログラム (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MAより入手可能) によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列をユーザーが指定する「ミスプライミングライブラリ (mispriming library)」を入力できる。また、Primer3は、特にマイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である (後の方の2つのプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれのソースから得ることができ、ユーザーの特定のニーズを満たすように変更することもできる)。PrimerGenプログラム (UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UKより入手可能) は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計するため、アラインメントされた核酸配列の最も保存された領域又は殆ど保存されない領域の何れかとハイブリダイズするプライマーを選択することができる。従って、このプログラムは、固有の保存されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。前述の任意の選択方法で同定されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、例えば、PCR法や配列決定のプライマー、マイクロアレイ要素、或いは核酸のサンプルにおいて完全又は部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定する特定のプローブとしてハイブリダイゼーション技術において有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上述の方法に限定されるものではない。

【0067】

用語「組換え核酸」は自然発生の配列ではなく、2つ以上の配列の異なる離隔されたセグメントを人工的に組み合わせた配列である。この人工的組み合わせは、化学合成によって実施する場合も多いが、より一般的には、例えば、前出の Sambrook (前出) に記載されたような遺伝工学的的手法によって核酸の離隔されたセ

グメントを人工的に操作する。この「組換え核酸」には、単に核酸の一部の付加、置換又は欠失によって変更された核酸も含まれる。組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に結合した核酸配列が含まれる場合もある。このような組換え核酸は、例えば、ある細胞を形質転換するために用いられるベクターの一部であり得る。

【0068】

或いは、このような組換え核酸は、この組換え核酸を発現する哺乳動物のワクチン接種に用いられ、その哺乳動物の防衛的な免疫応答を誘発するワクシニアウイルスに基づくウイルスベクターの一部であり得る。

【0069】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられる。CIRYPをコードする核酸若しくはその断片、又はCIRYP自体を含む疑いのあるサンプルには、体液や、細胞から分離された染色体、細胞小器官又は細胞膜からの抽出物や、細胞や、溶液中の、或いは固体支持体に結合したゲノムDNA、RNA又はcDNAや、組織や、組織プリント等が含まれ得る。

【0070】

用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子又は任意の天然若しくは合成の結合成分との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造（例えば、結合する分子が認識する抗原決定基、つまりエピトープ）の存在に左右されることを意味している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識された遊離した「A」及びその抗体を含む反応において、エピトープ「A」（つまり遊離し、標識されていない「A」）を含むポリヌクレオチドが存在することにより、抗体に結合する標識された「A」の量が低下する。

【0071】

用語「実質的に精製され」は、天然の環境から取り除かれた核酸配列又はアミノ酸配列であって、天然にはそれが結合して存在する他の構成成分から単離又は分離されて、その構成要素が少なくとも約60%、好ましくは約75%以上、最も好ましくは約90%以上除去された核酸配列又はアミノ酸配列である。

【0072】

用語「置換」は、1個又は2個以上のヌクレオチド或いはアミノ酸を、別のヌクレオチド或いはアミノ酸にそれぞれ置換することを意味する。

【0073】

用語「基板」は、膜、フィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気或いは非磁気のビーズ、ゲル、管、プレート、ポリマー、微細粒子、毛管を含む適切な固体又は半固体の支持体を指す。基板は、ポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する壁、溝、ピン、チャンネル及び孔等の様々な表面形態をとることが可能である。

【0074】

用語「形質転換」は、外来性のDNAが入り込み宿主細胞を変化させるプロセスを意味する。形質転換は、当業者に周知の種々の方法によって自然又は人工の条件下で起こり、またそれは外来性の核酸配列を原核細胞又は真核細胞の宿主細胞に導入するための任意の既知の方法に基づき得る。形質転換の方法は、形質転換される宿主細胞の種類によって選択され、それらには、以下に限定しないが、ウイルス感染、熱ショック、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法が含まれる。このような「形質転換された」細胞には、挿入されたDNAを自律的に複製するプラスミドとして、或いは宿主の染色体の一部として複製可能な安定的に形質転換された細胞や、限られた時間で導入されたDNAやRNAを発現する一時的に形質転換された細胞が含まれる。

【0075】

特定の核酸配列の「変異配列」とは、デフォルトのパラメーター設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を伴うblastnを用いて、所定の長さにおいて特定の核酸配列に対して少なくとも40%の配列の同一性を有することが明らかにされた核酸配列である。このような核酸の対は、所定の長さにおいて、例えば、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%若しくは98%又はそれ以上の同一性を示し得る。或る変異配列は、例えば、「アレル」（前述）、「スプライス」、「種」又は「多形性」変異配列と記述され得る。スプライス変異配列は、基準分子に対して有意な同一性を有し得るが、mRNAプロセッシング

の際のエキシソンの選択的スプライシングによってポリヌクレオチドの数がより多くなるか、或いは少なくなり得る。対応するポリペプチドは、更なる機能ドメインを有するか、或いは基準分子に存在するドメインが欠落し得る。種変異配列は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。生じるポリペプチドは、通常は互いに有意なアミノ酸同一性を有する。多形性変異配列は、所定の種の個々の間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なるものである。また、多形性変異配列には、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが変異する「1つのヌクレオチド多形性」(SNP)が含まれ得る。SNPの存在は、例えば、所定の個体群、病状又は病態の特徴を示唆し得る。

【0076】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、デフォルトのパラメーター設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を伴うblastpを用いて、ある核酸配列のある長さに対する該特定のポリペプチド配列の同一性が、少なくとも40%と決定された核酸配列のことである。所定の長さにおいて特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の配列の同一性を有することが明らかにされたポリペプチド配列である。このようなポリペプチドの対は、或る長さにおいて、例えば、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%若しくは98%又はそれ以上の同一性を示し得る。

【0077】

発明

本発明は、新規なヒト概日リズム関連タンパク質(CIRYP)、CIRYPをコードするポリヌクレオチド、並びに生殖障害、胃腸障害、神経障害及び発生障害の診断、治療又は予防のためのこれらの組成物の利用法の発見に基づくものである。

【0078】

本発明のCIRYP-1をコードする核酸は、核酸及び/又はアミノ酸配列アライメントについてのコンピュータ検索を用いて十二指腸のcDNAライブラリ(DUODNOTO1)からのインサイト社クローン1581473H1において同定された。コンセンサス配列、SEQ ID NO:3は、次に挙げる重複及び/又は伸長された核酸配列、インサイト社クローン1581473H1 (DUODNOTO1)、2604921H1 (LUNGTUT07)、816118R1 (OVAR

TUT01)、3253364H1(OVARTUN01)、879455T1 (THYRN0T02)及び1312037F1 (COLNFET02)から導出された。

【0079】

一実施例においては、図1A～図1Dに示すように、本発明はSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。CIRYP-1は、251個のアミノ酸の長さであり、残基S43、T120及びS135におけるカゼインキナーゼIIによる3つの潜在的リン酸化部位と、残基T70及びT120におけるプロテインキナーゼCによる2つの潜在的リン酸化部位とを有する。図3A及び図3Bに示すように、CIRYP-1は、CIRYP-2 (SEQ ID NO:2)、Dreg-2 (GI 1561732; SEQ ID NO:5) 及びCLK-1 (GI 3415017; SEQ ID NO:6) と化学的及び構造的類似性を有する。特にCIRYP-1及びDreg-2は、32%の同一性を共有する。CIRYP-1及びDreg-2の長さは概ね同等であり、それぞれ252個及び255個のアミノ酸の長さである。CIRYP-1、CIRYP-2、Dreg-2及びCLK-1は、11個の保存されたアミノ酸残基を共有する。CIRYP-1におけるこれらの残基は、M1、R22、W111、F137、R140、L150、F156、K167、A176、Y198及びL210である。更に、CIRYP-1は、CIRYP-2、Dreg-2及びCLK-1と保存された疎水性の残基を共有する。CIRYP-1におけるこれらの残基は、F83、G87、V94、L101、I145、M182及びF209である。概ね417番目から476番目までのヌクレオチドのSEQ ID NO:3の断片は、例えば、SEQ ID NO:3と関連する配列とを区別するためや、SEQ ID NO:3を同定するためのハイブリダイゼーション及び増幅技術において有用である。そのコードされたポリペプチドは、例えば免疫原性ペプチドとして有用である。ノーザン分析は、種々のライブラリにおいてこの配列の発現を示し、これらの少なくとも58%が癌に関係し、少なくとも18%が炎症及び免疫反応に関するものである。特に注目すべきは、胃腸組織におけるCIRYP-1の発現である。

【0080】

本発明のCIRYP-2をコードする核酸は、核酸及び/又はアミノ酸配列アライメントについてのコンピュータ検索を用いて子宮のcDNAライブラリ (UTRSNOT02) からのインサイト社クローン2267905H1において同定された。コンセンサス配列、SEQ ID NO:4は、次に挙げる重複及び/又は伸長された核酸配列、インサイト社クローン2267905H1 (UTRSNOT02)、2267905R6 (UTRSNOT02)、1550606H1 (PROSN

OT06)、1683318F6 (PROSNOT15)、4594189H1 (PROSTUT18)及び2733567H1 (OVARTU T04)並びにショットガン配列SAEB01465R1から導出された。

【0081】

一実施例においては、図2A～図2Cに示すように、本発明はSEQ ID NO:2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。CIRYP-2は、217個のアミノ酸の長さであり、残基N43における1つの潜在的Nグリコシル化部位と、残基S31におけるcAMP及びcGMP依存性タンパク質キナーゼによる1つの潜在的リン酸化部位と、残基T155におけるカゼインキナーゼIIによる1つの潜在的リン酸化部位と、残基S31及びS214におけるプロテインキナーゼCによる2つの潜在的リン酸化部位とを有する。図3A及び図3Bに示すように、CIRYP-2は、CLK-1 (GI 3415017; SEQ ID NO:6)、CIRYP-1 (SEQ ID NO:1)及びDreg-2 (GI 1561732; SEQ ID NO:5)と化学的及び構造的類似性を有する。特にCIRYP-2及びCLK-1は、85%の同一性を共有する。CIRYP-2及びCLK-1は、共に217個のアミノ酸の長さである。前述のように、CIRYP-1、CIRYP-2、Dreg-2及びCLK-1は、11個の保存されたアミノ酸残基を共有する。CIRYP-2におけるこれらの残基は、M1、R16、W87、F104、R107、L114、F120、K131、A140、Y164及びL168である。更に前述のように、CIRYP-2は、CLK-1、CIRYP-1及びDreg-2と保存された疎水性の残基を共有する。CIRYP-2におけるこれらの残基は、Y67、M71、V79、M86、L111及びY149である。概ね残基A58からL129に跨り、また概ね残基A140からL217まで繰返すCIRYP-2及びCLK-1の双方におけるTRCドメインの存在に留意されたい。概ね77番目から148番目までのヌクレオチドのSEQ ID NO:4の断片は、例えば、SEQ ID NO:4と関連する配列とを区別するためや、SEQ ID NO:4を同定するためのハイブリダイゼーション及び増幅技術において有用である。そのコードされたポリペプチドは、例えば免疫原性ペプチドとして有用である。ノーザン分析は、種々のライブラリにおいてこの配列の発現を示し、これらの少なくとも67%が癌に関係し、少なくとも19%が炎症及び免疫反応に関係するものである。特に注目すべきは、生殖組織におけるCIRYP-2の高度な発現(48%)である。

【0082】

また、本発明はCIRYPの変異体を含む。好適なCIRYP変異体は、CIRYPアミノ酸

配列に対して少なくとも約80%、或いは少なくとも約90%、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列の同一性を有し、またCIRYPの機能的若しくは構造的特徴の少なくとも1つを含む。

【0083】

更に、本発明はCIRYPをコードするポリヌクレオチドを包含する。特定の実施例において、本発明はCIRYPをコードするSEQ ID NO:3-4からなる群より選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を包含する。

【0084】

更に、本発明はCIRYPをコードするポリヌクレオチドの変異配列を含む。特に、そのようなポリヌクレオチドの変異配列は、CIRYPをコードするポリヌクレオチド配列に対して少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、更には少なくとも約95%のポリヌクレオチド配列の同一性を有する。本発明の特定の態様には、SEQ ID NO:3-4からなる群より選択された配列を含むポリヌクレオチド配列の変異配列が含まれ、それはSEQ ID NO:3-4からなる群より選択された核酸配列に対して少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、更には少なくとも約95%のポリヌクレオチド配列の同一性を有する。上記のポリヌクレオチドの変異配列は何れもCIRYPの機能的又は構造的特徴の少なくとも1つを含むアミノ酸配列をコードすることが可能である。

【0085】

遺伝暗号の縮重の結果、既知の遺伝子及び自然発生の遺伝子のポリヌクレオチド配列に対する最小の類似性を有する幾つかのものを含め、多数のCIRYPをコードするポリヌクレオチド配列が作り出されることが、当業者には理解されるであろう。従って、本発明は、可能なコドン選択に基づく組合せの選択により作り出され得るポリヌクレオチド配列の可能な全ての変異を考慮している。これらの組合せは自然発生のCIRYPのヌクレオチド配列に対し適用されるような標準のトリプレット遺伝暗号に従い作り出されるものであり、また全てのそのような変異はここに明確に開示されると考えられたい。

【0086】

CIRYPをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は、適切に選択された

厳密性の条件下において、自然発生のCIRYPのヌクレオチド配列に対してハイブリダイズ可能であることが好ましいが、それは非自然発生のコドンを含める等の実質的に異なるコドンの用法を有するCIRYP又はその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作り出すのに有利である。特定のコドンが宿主により利用される頻度に従い、真核生物又は原核生物の宿主においてペプチドの発現が起こる割合を高めるようにコドンを選択することができる。コードされるアミノ酸配列を変化させることなしにCIRYP及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、自然発生の配列から作り出された転写物よりも長い半減期のようなより望ましい特性を有するRNA転写物を作り出すためである。

【0087】

また本発明は、CIRYP及びCIRYPの誘導体をコードするDNA配列、又はその断片を専ら合成化学によって作り出すことを含む。作製の後に、合成配列を当業者によって周知の試薬を用いて任意の多数の利用可能な発現ベクター及び細胞系に挿入することが可能である。更に、合成化学を利用してCIRYPをコードする配列又はそれらの任意のフラグメントに突然変異を導入し得る。

【0088】

また本発明に包含されるものには、種々の厳密な条件の下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、また特にSEQ ID NO:3-4並びにそれらの断片に対してハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G.M. 及びS.L. Berger(1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; Kimmel, A.R.(1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511参照)。ハイブリダイゼーション条件には、「定義」に記載したアニーリング及び洗浄条件が含まれる。

【0089】

DNA塩基配列決定方法は周知のものであり、本発明の任意の実施例においても利用され得る。その方法は、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland, OH)、Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer)、耐熱性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)、或いはELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD) において発見されたようなプルーフリーディングエキソヌクレアーゼ及びポリメラーゼの組合

せのような酵素を使用する。配列の準備は、MICROLAB 2200 liquid transfer system (Hamilton, Reno NV)、PTC200 thermal cycler (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800 thermal cycler (Perkin-Elmer) のような装置によって自動化することが好ましい。次に、ABI 373若しくは377 DNAシーケンシングシステム (Perkin-Elmer)、MEGABACE 1000 DNA sequencing system (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) 又は他の周知の装置を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当業者に周知の種々のアルゴリズムを用いて分析する (例えば、Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7; Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853を参照)。

【0090】

CIRYPをコードする核酸配列は、部分的なヌクレオチド配列を用いて先行技術において周知の種々のPCR法をベースとした方法で伸長し、プロモータ及び調節エレメントのような上流の配列を検出することができる。例えば、用いられる方法の1つである制限部位PCR法は、一般的なプライマー及びネスト化プライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する (例えば、Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic. 2:318-322を参照)。逆PCR法を用いる別の方法では、多岐に伸長して環状化鑄型から未知の配列を増幅するプライマーを用いる。この鑄型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限酵素断片に由来する。(Triglia, T.ら (1988) Nucleic Acids Res. 16:8186)。第3の方法として、キャプチャーPCR法(capture PCR)には、ヒト及び酵母菌の人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片のPCR増幅が含まれる (例えば、Lagerstrom, M.ら (1991) PCR Methods Applic 1:111-119を参照)。この方法では、多数の制限酵素の消化及びライゲーションを用いて、PCRを行う前に未知の配列の領域に組換え2本鎖配列を挿入することができる。また、未知の配列を回収するのに用いられ得る他の方法が当業者に周知である (例えば、Parker, J.D.ら (1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-306を参照)。更に、PCR法、ネスト化プライマー、PROMOTERFINDERライブラリ (Clonetech, Palo Alto, CA) を用いて

、ゲノムDNA内の歩行が可能である。この方法ではライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン移行部の発見に有用である。全てのPCR法をベースとした方法については、プライマーは、OLIGO™ 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, MN) のような市販のソフトウェア又は別の適切なプログラムを用いて、長さが22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、また約68 ~ 72 の温度で鋳型に対してアニーリングするよう設計され得る。

【0091】

完全長cDNAをスクリーニングするとき、大きなcDNAを含むようにサイズ選択されたライブラリを用いることが好ましい。また、遺伝子の5'領域を配列を含むことが多いランダムプライム (random-primed) ライブラリは、oligo d(T)ライブラリで完全な長さのcDNAを得られない場合に好適である。またゲノムライブラリは、5'非転写領域における配列の伸長のために役立ち得る。

【0092】

配列決定やPCRの産物のヌクレオチド配列のサイズ分析又は確認のために、市販のキャピラリー電気泳動法システムを用いることができる。特に、キャピラリーシーケンシングでは、電気泳動分離のための流動性ポリマー、4つの異なるヌクレオチドに特異的なレーザーで活性化される蛍光色素、及び放射された波長の検出を行うCCDカメラを使用し得る。出力/光強度は適切なソフトウェア(例えば、GENOTYPER及びSEQUENCE NAVIGATOR (Perkin Elmer))を用いて電気信号に変換され、サンプルのローディングからコンピュータ解析及び電子データ表示までの全過程がコンピュータ制御され得る。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプル内に限られた量だけしか存在しないこともあるDNAの小片の配列決定に特に好適である。

【0093】

本発明の別の実施例では、CIRYPをコードするポリヌクレオチド配列又はその断片を組換えDNA分子に用いて、CIRYP、その断片又はその機能的等価物の適切な宿主細胞内における発現を指向することができる。遺伝暗号の固有の縮重によって、実質的に同一、即ち機能的に等価なアミノ酸配列をコードする他のDNA配列

が作り出され、CIRYPの発現のために用いることができる。

【0094】

限定はしないが遺伝子産物のクローニング、プロセッシング及び/又は発現を改変すること等の種々の理由により、CIRYPをコードする配列を改変するために、本発明のヌクレオチド配列を当業者に周知の方法を用いて操作可能である。ランダムな断片化によるDNA混合や、遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのPCR再構成を用いて、ヌクレオチド配列を操作できる。例えば、オリゴヌクレオチド媒介の部位特異的変異誘発により、新しい制限部位を生成する突然変異の挿入、グリコシル化パターンの変更、コドン選好の変化、スプライシングバリエーションの生成等が可能である。

【0095】

本発明のヌクレオチドにMOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; described in U.S. Patent Number 5,837,458; Chang, C.-C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)等のDNAシャッフリング技術を適用して、CIRYPの生物学的若しくは酵素的な活性又は他の分子や化合物と結合する能力等のCIRYPの生物学的特性を変更又は改善することができる。DNAシャッフリングは、PCR媒介の遺伝子断片の組換えを利用して遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。次に、そのライブラリに対して、所望の特性を有する遺伝子変異体を同定する選択或いはスクリーニングを実施する。次に、これらの好適な変異体をプールして、更に繰返しDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングが実施され得る。従って、「人工的」な育種及び急速な分子進化によって遺伝子の多様性が生み出される。例えば、不規則な位置の変異を含む単一の遺伝子の断片を組換え、スクリーニングし、更に所望の特性が最適化されるまで再シャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子の断片を、同一或いは異なる種の同じ遺伝子ファミリーの相同的な遺伝子の断片で組換えて、管理されかつ調節可能な方法によって多数の天然の遺伝子の多様性を最大化することができる。

【0096】

本発明の別の実施例では、当業者に周知の化学的手法を用いて、CIRYPをコードする配列の全体、或いはその一部を合成することができる（例えば、Caruthers, M.H. ら (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215-223 ; Horn, T. ら (1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232 参照）。或いは、化学的手法を用いて、CIRYPそのもの又はその断片を合成することができる。例えば、種々の固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる（例えば、Roberge, J.Y. ら (1995) Science 269:202-204 参照）。また、ABI 431A ペプチドシンセサイザ (Perkin Elmer) を用いて合成の自動化を行なうことができる。更に、CIRYPのアミノ酸配列若しくはその任意の部分を、直接の合成において改変することにより、並びに / 又は他のタンパク質若しくはその任意の部分に由来する配列と結合させることにより、変異体ポリペプチドを生成可能である。

【0097】

そのペプチドは、分離用の高速液体クロマトグラフィにより実質的に精製することができる（例えば、Chiez, R.M. 及び Regnier, F.Z. (1990) Methods Enzymol. 182:392-421 参照）。合成されたペプチドの組成は、アミノ酸解析或いは配列決定法により確認することができる（Creighton, T. (1983) Proteins. Structure and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY）。

【0098】

生物学的に活性なCIRYPを発現させるために、CIRYPをコードするヌクレオチド配列又はその誘導体を、適切な発現ベクター（即ち、適切な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳に必要なエレメントを含むベクター）に挿入する。これらのエレメントには、ベクター及びCIRYPをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5' 及び3' の非翻訳領域等の調節配列が含まれる。このようなエレメントの長さ及び特異性は変化し得る。特定の開始シグナルを利用して、CIRYPをコードする配列のより効果的な翻訳を行なうことが可能である。このようなシグナルには、ATG開始コドンや例えばコザック配列等の隣接する配列が含まれる。CIRYPをコードする配列、その開始コドン、及び上流の調節配列が、適切な発現ベクターに挿入された場合は、付加的な転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは不用となり得る。しか

しながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、読み枠の中のATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターによって与えられなければならない。外来性の翻訳エレメント及び開始コドンは、天然及び合成の種々のものからなり得る。用いられる特定の宿主細胞株に適切なエンハンサーを含むことにより、発現の効率を高めることが可能である（例えば、Scharf, D. ら (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162を参照）。

【0099】

CIRYPをコードする配列及び適切な転写や翻訳の調節領域を含む発現ベクターを作製するために、当業者に周知の方法が用いられる。これらの方法には、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、及び*in vivo*遺伝的組換え技術が含まれる（例えば、Sambrook, J. ら (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, ch.4,8,及び16-17; Ausubel, F.M. ら (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, ch.9,13及び16を参照）。

【0100】

CIRYPをコードする配列を包含し、発現するために、種々の発現ベクター/宿主系が利用できる。これらには、以下に限定しないが、組換え型のバクテリオファージ、プラスミド或いはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌のような微生物や、酵母菌発現ベクターで形質転換した酵母菌や、ウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系や、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) 又はタバコモザイクウイルス (TMV)）或いは細菌の発現ベクター（例えば、Ti又はpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系や、或いは動物細胞系が含まれる。本発明は、利用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【0101】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターを、CIRYPをコードするポリヌクレオチド配列の使用の目的に応じて選択できる。例えば、CIRYPをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング、及び増殖は、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) 又はpSport1 plasmid

(Life Technologies)等の多機能性E.coliベクターを用いて実施することが可能である。ベクターの多数のクローニング部位へのCIRYPをコードする配列のライゲーションによりlacZ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更に、これらのベクターは、クローニングされた配列の*in vitro*での転写、ジデオキシクエンシング、ヘルパーファージによる1本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成に有用である(例えば、Van Heeke, G.及びS.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509を参照)。例えば、抗体産生の目的等に多量のCIRYPが必要な場合、ハイレベルなCIRYPの発現をもたらすベクターが用いられ得る。例えば、強力な誘発性のT5又はT7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが用いられ得る。

【0102】

CIRYPの生成に酵母の発現系を利用できる。酵母菌*Saccharomyces cerevisiae*又は*Pichia pastoris*において、因子、アルコールオキシダーゼ、及びPGHなどの構成型又は誘導型のプロモーターを含む多種のベクターを使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌若しくは細胞内保持の何れかを導き、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来性の配列を組み込みを可能とする(例えば、上記のAusubel, 前出; 及びGrantら(1987) Methods Enzymol. 153:516-54; Scorer, C.A.ら(1994) Bio/Technology 12:181-184を参照)。

【0103】

植物系もCIRYPの発現に使用できる。CIRYPをコードする配列の転写は、ウイルス性のプロモータ(例えば、CaMVの35S及び19Sプロモーター単独、又はTMV由来のオメガリーダー配列との組み合わせ)で促進され得る(Takamatsu, N.ら(1987) EMBO J. 6:307-311)。これらの作製物は、直接のDNA形質転換又は病原体媒介の形質移入によって、植物細胞中に導入可能である。(例えば、The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology(1992) McGraw Hill, New York; pp.191-196を参照)。

【0104】

哺乳動物の細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスが用いられる場合、CIRYPをコード

する配列が、後発のプロモータ及び三連のリーダー配列からなるアデノウイルス転写/翻訳複合体の中に結合され得る。ウイルスのゲノムの非必須E1又はE3領域における挿入により、宿主細胞においてCIRYPを発現する感染性のウイルスが得られる(例えば、Logan, J.及びShenk, T.(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659を参照)。さらに、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーのような転写エンハンサーを、哺乳類の宿主細胞内の発現を増大させるために用いることができる。また、タンパク質の高レベルの発現のために、SV40又はEBVをベースとしたベクターを用いることができる。

【0105】

また、ヒト人工染色体(HAC)を用いることにより、プラスミドに含まれ発現され得るものに比べてより大きなDNAの断片を供給することもできる。治療を目的とし、6kb~10MbのHACを構築して従来のデリバリー方法(リポソーム、ポリカチオンのアミノポリマー、又は小胞)を介して供給することができる(例えば、Harrington, J. J.ら(1997) Nat Genet. 15:345-355)。

【0106】

哺乳類系の組換え型タンパク質の産生を長期間にわたり確保するためには、細胞株におけるCIRYPの安定した発現が好ましい。例えば、発現ベクターを用いてCIRYPをコードする配列を細胞株に形質転換することが可能であり、その発現ベクターには、ウイルス起源の複製及び/若しくは内在性の発現エレメント並びに同一或いは個別のベクターの上の選択マーカー遺伝子が含まれる。ベクターの導入の後、選択培地に切り替える前に濃縮培地内で細胞を1~2日間増殖させる。選択可能なマーカーの目的は、選択的な媒介物に対して耐性を与えることであり、またそ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及び回収が可能とすることである。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞の型に適した組織培養技術を用いて増殖することができる。

【0107】

形質転換された細胞株を回収するために任意の数の選択系を用いることができる。これらには、以下に限定しないが、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれ、それぞれは

、tk^r及びapr^r細胞において用いられる(例えば、Wigler, M.ら(1977)Cell 11: 223-32; Lowy, I.ら(1980)Cell 22:817-23参照)。また代謝拮抗剤、抗生剤或いは除草剤への耐性を選択の基礎として用いることが可能で、例えばdhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、als或いはpatはクロルスルフロン(chlorsulfuron)、ホスフィントリシンアセチルトランスフェラーゼ(phosphinotricin acetyltransferase)に対する耐性を与える(例えば、Wigler, M.ら(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-70; Colberre-Garapin, F.ら(1981) J. Mol. Biol. 150:1-14を参照)。さらに選択可能な遺伝子として、例えば、代謝産物に対する細胞の必要性を変更するtrpB及びhisDが文献に記載されている(例えば、Hartman, S.C.及びR.C. Mulligan(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-8051参照)。例えば、アントシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、 β -グルクロニダーゼ及びその基質 β -グルクロニド、又はルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等の可視マーカーを利用できる。これらのマーカーは形質転換体を同定するだけでなく、特定のベクター系による一過性の或いは安定的なタンパク質発現の量を定量するために広く用いられる(例えば、Rhodes, C.A.ら(1995)Methods Mol. Biol. 55:121-131参照)。

【0108】

マーカー遺伝子発現の存在/非存在によって目的の遺伝子の存在も示唆されるが、その遺伝子の存在及び発現の確認を必要とすることもある。例えばCIRYPをコードする配列がマーカー遺伝子配列内に挿入された場合、CIRYPをコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子の機能が存在しないことにより同定できる。或いは、単一のプロモータの制御下において、CIRYPをコードする配列とマーカー遺伝子を直列に配置することができる。選択又は誘導に応じた標識遺伝子の発現は、通常直列に配置された配列の発現も同様に示す。

【0109】

一般に、当業者に周知の様々な方法により、CIRYPをコードする核酸配列を含みCIRYPを発現する宿主細胞を同定できる。このような方法には、以下に限定しないが、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーション、PCR増幅、並びに核

酸とタンパク質配列を検出及び/若しくは定量するための技術に基づく膜、溶液、若しくはチップを含むタンパク質バイオアッセイ又はイムノアッセイが含まれる。

【0110】

特異的なポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体のいずれかを用いる CIRYP の発現を検出・測定するための免疫学的手法は、当業者に周知のものである。そのような技術の例には、酵素結合免疫検定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIAs) 及び蛍光細胞分析分離 (FACS) が含まれる。CIRYP 上において2つの非干渉エピトープに対して反応するモノクローナル抗体を利用する二部位のモノクローナルベースのイムノアッセイ (two-site, monoclonal-based immunoassay) が好ましいが、競合的結合実験も用いられうる。これらアッセイ及び他のアッセイは、当業者によって開示されている (例えば、Hampton, R.ら(1990); Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN Section IV; Coligan, J. E.ら(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; 及びPound, J.D.(1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJを参照)。

【0111】

多様なラベル及び結合技術が当業者には周知であり、そして種々の核酸及びアミノ酸のアッセイにおいて用いることができる。CIRYPをコードするポリヌクレオチドに関係する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブやPCRプローブを作製するための手段には、オリゴラベリング法 (oligolabeling)、ニックトランスレーション法、末端標識 (end-labeling)、或いは標識ヌクレオチドを用いるPCR増幅などが含まれる。或いは、CIRYPをコードする配列、又はその任意の断片を、mRNAプローブの作製のためのベクターにクローン化できる。そのようなベクターは当業者に周知で、また市販されており、これを用いて、例えばT7、T3或いはSP6のような適切なRNAポリメラーゼ及び標識したヌクレオチドを加えることによって in vitro でRNAプローブを合成することができる。これらの方法は、種々の市販のキット (Amersham Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、及びUS Biochemical提供) を用いて実施することができる。検出を

容易にするために用いる適切なレポーター分子、即ち標識には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤或いは色素生産剤や、基質、コファクター、インヒビター、磁性粒子等が含まれる。

【0112】

細胞培養からのタンパク質の回収及び発現に適した条件下において、CIRYPをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞を培養することができる。形質転換された細胞により産生されるタンパク質は、用いられる配列及び/又はベクターに応じて分泌されるか、又は細胞内に保持され得る。当業者に理解されるように、CIRYPをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核生物か真核生物の細胞膜を通してCIRYP分泌を指向するシグナル配列を含むように設計することができる。

【0113】

更に、宿主細胞株は、挿入した配列の発現の調節能力又は発現したタンパク質を所望の形にプロセッシングする能力によって選択される。このようなポリペプチドの修飾には、以下に限定するものではないが、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化(lipidation)、及びアシル化が含まれる。タンパク質の「prepro」形を切断する翻訳後プロセッシングを用いて、タンパク質の標的、折り畳み及び/又は活性を特定することができる。翻訳後の活性のための特定の特徴的な機構及び細胞装置を有する種々の宿主細胞(例えば、CHO、HeLa、MDCK、MEK293、及びWI38)は、American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)より入手可能であり、外来性のタンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にするために選択され得る。

【0114】

本発明の別の実施例では、CIRYPをコードする天然の核酸、改変された核酸、又は組換えの核酸配列を、前述の任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に結合させ得る。例えば、市販の抗体によって識別できる異種部分を含むキメラCIRYPタンパク質が、CIRYPの活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、市販の親和性の基質を用いて、異種タンパク質及びペプチド部分が、融合タンパク質の精製を促進し得る。このよう

な部分には、以下に限定されるものではないが、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) が含まれる。GST、MBP、Trx、CBP、及び6-Hisによって、固定されたグルタチオン、マルトース、フェニルアルシン酸化物、カルモジュリン、及び金属キレート樹脂の各々で同族の融合タンパク質の精製が可能となる。FLAG、c-mc、及び赤血球凝集素 (HA) によって、これらのエピトープ標識を特異的に識別する市販のモノクロナール抗体及びポリクロナール抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性の精製が可能である。また、CIRYPをコードする配列と異種タンパク質配列との間に位置するタンパク質切断部位を融合タンパク質が含むように、融合タンパク質が操作されて、精製の後にCIRYPが異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現及び精製方法については、Ausubelの文献 (1995, 前出, ch 10) に記載されている。また、融合タンパク質の発現及び精製の促進のために、種々の市販のキットを用いることができる。

【0115】

本発明の更に別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液又はコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて *in vitro* で放射能標識したCIRYPの合成を行なうことができる。これらの系は、T7、T3、又はSP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質をコードする配列の転写と翻訳を結びつける。転写は放射能標識されたアミノ酸前駆体 (好ましくは³⁵S-メチオニン) の存在の下で起こる。

【0116】

組換え体の生成だけでなく、固相技術を用いた直接のペプチド合成によって、CIRYPの断片を作り出すことができる (例えば、Creighton, 前出 pp.55-60を参照)。タンパク質合成は手作業又は自動で行なうことができる。自動化された合成は、例えば、ABI 431Aペプチドシンセサイザ (Perkin Elmer) を用いて行うことができる。CIRYPの種々の断片を個別に合成して、次に結合させて完全長分子を作り出すことも可能である。

【0117】

治療

D. melanogasterのDreg-2 (GI 1561732) 及びマウスCLK-1 (GI 3415017) 等の生物学的タイミングにおいて一定の役割を果たすタンパク質とCIRYPの領域との間には、例えば、配列及びモチーフの文脈における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、CIRYPの発現は、胃腸組織、生殖組織及び神経組織と密接な関係を有する。従って、CIRYPは、生殖障害、胃腸障害、神経障害及び発生障害において一定の役割を果たしていると考えられる。CIRYPの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、CIRYPの発現若しくは活性を低下させることが望ましい。CIRYPの発現若しくは活性の低下に関連する疾患の治療においては、CIRYPの発現若しくは活性を増大させることが望ましい。

【0118】

従って、一実施例においては、CIRYPの発現若しくは活性の低下に関連する疾患の治療又は予防のためにCIRYP又はその断片若しくは誘導体を患者に投与することができる。そのような疾患の例には、以下に限定しないが、プロラクチン産生異常や、卵管異常、排卵異常、及び子宮内膜症を含む不妊症や、発情周期の混乱、月経周期の混乱、多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過刺激症候群、子宮内膜や卵巣の腫瘍、子宮筋腫、自己免疫異常、異所的妊娠、及び奇形発生や、乳房の癌、乳房線維嚢胞病及び溢乳や、精子形成の混乱、異常性精子生理、精巣の癌、前立腺の癌、良性の前立腺肥大症、前立腺炎、ペイロニー病(Peyronie's disease)、男性の乳房および女性化乳房の癌等の生殖障害；並びに嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アンギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血及び後天性免疫不全症候群(AIDS)の胃腸障害；並びに静座不能、アルツハイマー病、健忘症、筋萎縮性側索硬化、双極性障害、緊張病、脳腫瘍、痴呆、鬱病、糖尿病性ニューロパシー、ダウン症候群、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、てんかん、ハンチントン病、末梢神経疾患、多発

性硬化症、神経線維腫症、パーキンソン病、妄想性精神病、帯状疱疹後神経痛、分裂症、季節的感情障害 (seasonal affective disorder; SAD) 及びトゥレット病等の神経障害；並びに尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ ベッカー型筋ジストロフィ、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群 (ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱)、スミス マジェニス症候群 (Smith- Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、舞蹈病 (Sydenham's chorea) 及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失等の発生障害が含まれる。

【0119】

別の実施例においては、限定はしないが上述のものを含むCIRYPの発現若しくは活性の低下に関連する疾患の治療又は予防のために、CIRYP又はその断片若しくは誘導体を発現可能なベクターを患者に投与してもよい。

【0120】

また別の実施例においては、限定はしないが上述のものを含むCIRYPの発現若しくは活性の低下に関連する疾患の治療又は予防のために、適切な医薬用担体と共に精製されたCIRYPを含む医薬品組成物を患者に投与してもよい。

【0121】

また別の実施例においては、限定はしないが上述のものを含むCIRYPの発現若しくは活性の低下に関連する疾患の治療又は予防のために、CIRYPの活性を調節するアゴニストを患者に投与してもよい。

【0122】

更に別の実施例においては、CIRYPの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療又は予防のために、CIRYPのアンタゴニストを患者に投与してもよい。そのような疾患の例には、以下に限定はしないが、上述の生殖障害、胃腸障害、神経障害及び発生障害が含まれる。一実施態様では、CIRYPと特異的に結合する抗体をアンタゴニストとして直接用いるか、或いはCIRYPを発現する細胞や組織に薬剤をもたらす送達機構又はターゲティングとして間接的に用いることができる

。

【0123】

別の実施例においては、限定はしないが上述のものを含むCIRYPの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療又は予防のために、CIRYPをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現可能なベクターを患者に投与してもよい。

【0124】

他の実施例においては、本発明のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補的配列又はベクターの何れかを、他の適切な治療薬と組合せて投与することもできる。当業者は従来の製薬の原理に基づいて併用療法で使用するための適切な薬剤を選択することができるであろう。治療薬を組み合わせることにより、上述の種々の反応の治療又は予防に効果を与えるように相乗剂的に機能し得る。この方法を用いることにより、より少ない各薬剤の投与量で治療効果を上げることができ、従って副作用の可能性を低下させることができる。

CIRYPのアンタゴニストは、当業者に周知の方法を用いて製造することができる。詳細には、精製されたCIRYPを用いて抗体を作り出したり、或いはCIRYPに特異的に結合するものを同定するために、薬剤のライブラリをスクリーニングすることができる。CIRYPの抗体は、当業者によく知られた方法を用いて産生することができる。このような抗体には、以下に限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、及びFab発現ライブラリにより作られたフラグメントが含まれる。中和抗体（即ち、二量体形成を阻害するもの）は治療の用途に特に好適である。

【0125】

抗体を産生するために、CIRYPか、免疫学的特性を有するその任意の断片或いはそのオリゴペプチドを注射することによって、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト等を含む種々の宿主を免疫化することができる。ラット及びマウスは、モノクローナル抗体生成を含むダウンストリーム適用のための宿主として好ましい。宿主の種に応じて、免疫学的反応を増強するために種々のアジュバントを用いることができる。そのようなアジュバントには、以下に限定しないが、フロイントのアジュバント、アルミニウムの水酸化物のようなミネラルゲル、リゾレシチン

のような界面活性剤、プルロニックポリオール(pluronic polyols)、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、KLH及びジニトロフェノールが含まれる。ヒトで使用するアジュバントの中では、BCG(カルメット ゲラン桿菌)及びCornebacterium parvumが特に好ましい。

【0126】

CIRYPの抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド又はその断片は、少なくとも5個のアミノ酸、また一般的には少なくとも10個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有する。またこれらのオリゴペプチド、ペプチド、又は断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一で、小形の天然の分子の全アミノ酸配列を含んでいることが好ましい。CIRYPアミノ酸の短い伸展部が、KLHのような別のタンパク質の伸展部と融合し、キメラ分子の抗体が産生され得る。

【0127】

CIRYPのモノクローナル抗体は、培養における持続的な細胞株によって抗体分子を産生させる任意の技術を用いて調製できる。このような技術には、以下に限定しないが、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、及びEBV-ハイブリドーマ技術が含まれる(例えば、Kohler, G.ら(1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D.ら(1985) Immunol. Methods 81 :31-42; Cote, R.J.ら(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030; Cole, S.P.ら(1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120参照)。

【0128】

更に、適切な抗原特異性及び生物活性を備えた分子を得るために、ヒト抗体遺伝子へのマウス抗体遺伝子のスプライシングする技術のような「キメラ抗体」の産生のために開発された技術を用いることができる(例えば、Morrison, S.L.ら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855; Neuberger, M.S.ら(1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.ら(1985) Nature 314:452-454参照)。或いは、当業者に周知の方法を用いて単鎖の抗体の生成のための技術を適用して、CIRYPに特異的な単鎖抗体を産生することができる。関連する特異性を有するがイディオタイプ組成が異なる抗体は、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリから

の鎖混合(chain shuffling)によって産生することができる(例えば、Burton D. R.(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:10134-10137参照)。

【0129】

抗体は、免疫グロブリンライブラリ又は高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることにより、或いはリンパ球集団でのin vivoの産生を誘導することにより産生することができる(例えば、Orlandi, R.ら(1989), Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3833-3837; Winter, G.ら(1991) Nature 349:293-299参照)。

【0130】

またCIRYPに対する特異的な結合部位を含む抗体フラグメントも作り出すことができる。例えばこのような断片には、以下に限定はしないが、抗体分子のペプシン消化により生成することができるF(ab')₂フラグメントや、F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を減らすことにより生成することができるFabフラグメントが含まれる。或いは、所望の特異性を備えたモノクローナルFabフラグメントを迅速かつ容易に同定可能なように、Fab発現ライブラリを構成し得る(例えば、Huse, W.D.ら(1989) Science 246:1275-1281参照)。

【0131】

種々のイムノアッセイを、所望の特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングに用いることができる。確立された特異性を有するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の何れかを用いる競合的結合アッセイ或いは免疫放射線測定法の多数のプロトコルが、当技術分野で周知である。このようなイムノアッセイには、一般にCIRYPとその特異的な抗体との間の複合体の形成の測定が含まれる。2つの非干渉CIRYPエピトープに対して反応するモノクローナル抗体を用いる2部位のモノクローナル抗体ベースのイムノアッセイ(two sites monoclonal based immunoassay)が通常は用いられるが、競合的結合アッセイも用いられ得る(Pound, 前出)。

【0132】

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析等の種々の方法を用いて、CIRYP抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数Kaで表すが、このKaは、平衡状態におけるOP抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で割ったもの

として定義される。多数のCIRYPエピトープに対して親和性が不均一なポリクロナール抗体試薬に対して測定された K_a は、CIRYP抗体の平均親和性又は結合活性を表す。特定のCIRYPエピトープに単一特異的なモノクロナール抗体試薬に対して測定された K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a の値が $10^9 \sim 10^{12}$ L/molの高い親和性の抗体試薬は、CIRYP抗体複合体が厳密な操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。 K_a の値が $10^6 \sim 10^7$ L/molの低い親和性の抗体試薬は、最終的にCIRYPが活性化状態で抗体から解離する必要がある免疫精製(immunopurification)及び類似の処理に用いるのが好ましい。(Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach. IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E.及びCryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0133】

ポリクロナール抗体試薬のタイター及び結合活性を更に評価して、ある一定のダウンストリーム適用に対するこのような試薬の品質及び適合性を判定する。例えば、少なくとも1~2mg/mlの特異的な抗体、好ましくは5~10mg/mlの特異的な抗体を含むポリクロナール抗体試薬が、CIRYP抗体複合体の沈殿を必要とする方法に通常は使用される。種々の適用における抗体の特異性、タイター、及び結合活性に対する処理、並びに抗体の品質や使用法の指針は一般に入手可能である(例えば、Catty, 前出、及びColiganら, 前出を参照)。

【0134】

本発明の別の実施例では、CIRYPをコードするポリヌクレオチド、又はその任意の断片や相補配列を、治療を目的として用いることができる。一態様では、mRNAの転写を阻害することが望ましい状況において、CIRYPをコードするポリヌクレオチドに対する相補配列を用いることができる。詳細には、CIRYPをコードするポリヌクレオチドに相補的な配列で細胞を形質転換することができる。従って、CIRYPの活性を調節する、或いは遺伝子の機能を調節するために、相補的な分子又は断片を用いることができる。現在このような技術は周知であり、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド、或いはより大きな断片を、CIRYPをコードする配列のコード領域や調節領域に従って様々な位置から設計可能である。

【0135】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペス又はワクシニアウイルスに由来する、或いは種々の細菌性プラスミドに由来する発現ベクターは、標的の器官、組織、即ち細胞群へのヌクレオチド配列の送達のために用いられ得る。当業者に周知の方法を用いて、CIRYPをコードするポリヌクレオチドに相補的な核酸配列を発現するためのベクターを産生することができる（例えば、Sambrook, 前出、及びAusubel, 1995, 前出 参照）。

【0136】

CIRYPをコードするポリヌクレオチド又はその断片を高レベルで発現する発現ベクターで細胞又は組織を形質転換させることによって、CIRYPをコードする遺伝子を作り出すことができる。このような作製物は、翻訳不能なセンス配列或いはアンチセンス配列を細胞に導入するために用いることができる。DNAへ組み込みが存在しない場合でも、このようなベクターは、それらが内在性のヌクレアーゼにより無能となるまで、RNA分子を転写し続け得る。一過性の発現は、非複製ベクターでも1ヶ月以上、適切な複製エレメントがベクター系の一部である場合にはさらに長い期間持続し得る。

【0137】

前述のように、CIRYPをコードする遺伝子の制御、5'、又は調節領域に対する相補配列、つまりアンチセンス分子（DNA、RNA又はPNA）を設計することによって、遺伝子発現を変更することができる。転写開始点（例えば、開始部位から+10~-10の位置）に由来するオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、三重らせん体の塩基対形成方法論を用いて、阻害を達成することができる。ポリメラーゼ、転写制御因子、或いは調節分子の結合のために二重らせんが十分にほどける能力を阻害するので、三重らせん対合は有用である（例えば、Gee, J.E.ら(1994) In: Huber, B.E.及びB.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt.Kisco, NY, pp.163-177参照）。転写物のリボソームへの結合を阻止することによりmRNAの転写を阻害するために、相補的配列、即ちアンチセンス分子を設計し得る。

【0138】

リボザイム、つまり酵素RNA分子を用いてRNAの特異的切断を触媒することができる。リボザイム作用機構は、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列の特異的ハイブリダイゼーションに関与し、その後のヌクレオチド鎖切断が行なわれる。例えば、操作されたハンマーヘッド・モチーフ・リボザイム分子は、CIRYPをコードする配列のヌクレオチド鎖切断を特異的かつ効果的に触媒し得る。

【0139】

任意の潜在的なRNA標的物内の特異的なリボザイム切断部位は、最初、後続する配列GUA、GUU並びにGUCを含むリボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンニングすることによって同定される。一度同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15~20個のリボヌクレオチドの間の短いRNA配列は、そのオリゴヌクレオチドを非機能的(inoperable)とする2次の構造的特徴について評価することができる。また候補の標的の適合性は、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用い、相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに対する接触性(accessibility)の検査により評価することができる。

【0140】

本発明の相補的リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子を合成するための当技術分野で周知の方法により作り出すことができる。これらには、固相ホスホラミダイト化学合成のようなオリゴヌクレオチドの化学的合成のための技術が含まれる。或いは、RNA分子は、CIRYPをコードするDNA配列のin vitro及びin vivoの転写により作り出すことができる。このようなDNA配列は、T7或いはSP6のような適切なRNAポリメラーゼプロモーターを伴う多様なベクターに取り込むことができる。或いは、構成的又は誘導的に相補的なRNAを合成するこれらのcDNA作製物は、株化細胞、細胞又は組織内に導入することができる。

【0141】

細胞内の安定性を高め、また半減期を長くするために、RNA分子は修飾することができる。可能な修飾としては、以下に限定しないが、その分子の5'末端及び/又は3'末端でのフランキング配列の付加や、分子のバックボーン内におけるホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオネート或いは2'-O-メチルを使用を含む。この概念はPNA生成において固有のものであり、内在性エンドヌク

レアーゼにより容易に認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンの、アセチル -、メチル -、チオ -、及び類似の修飾形態だけでなく、イノシン、キェオシン、及びワイプトシンのような従来よりあまり用いられない塩基を含めることにより、これら全ての分子に拡張可能である。

【0142】

細胞或いは組織内にベクターを導入するための多くの方法が利用可能で、同様に in vivo、in vitro、及び ex vivo での使用にも適している。ex vivo での治療法に対し、ベクターを患者から採取された幹細胞に導入し、自己移植して同じ患者に戻すためにクローンとして増殖させることができる。トランスフェクションによるデリバリー、或いはリポソーム注入又はポリカチオンアミノポリマーによるデリバリーは、当技術分野でよく知られた方法を用いて実施することができる（例えば、Goldman, C.K.ら(1997) Nature Biotechnology 15:462-466参照）。

【0143】

前述の治療法は何れも、例えばヒト、イヌ、ネコ、雌ウシ、ウマ、ウサギ及びサル等の哺乳類を含む、治療が必要な任意の対象に適用することができる。

【0144】

本発明の更なる実施例では、前述の任意の治療効果のために、医薬成分を薬剤上受け入れられる担体とともに投与する。このような医薬成分は、CIRYP、CIRYPの抗体、CIRYPの模倣体、アゴニスト、アンタゴニスト又はインヒビターからなるものであり得る。この成分は、単体或いは例えば安定化する配合ような1以上の他の薬剤とともに、任意の無菌の生体適合性の医薬用担体に投与され、その担体には、以下に限定しないが、生理食塩水、バッファー食塩水、ブドウ糖或いは水が含まれる。このような組成物は、単体或いは他の薬剤、ドラッグやホルモンと結合した形で患者に投与されうる。

【0145】

本発明で用いられる医薬品組成物の投与経路には、以下に限定されないが、経口投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、髄内投与、くも膜下腔内投与、脳室内投与、経皮投与、皮下投与、腹腔内投与、鼻腔内投与、経腸投与、局所的

投与、舌下投与又は直腸投与が含まれ得る。

【0146】

有効成分に加えて、これらの医薬成分は、有効成分を医薬上使用できる製剤にするための処理を容易にする医薬品添加物及び補助剤を含む、適切な医薬上認められる担体を含みうる。更に、製剤或いは投与に関する技術の詳細は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA) の最新版に記載されている。

【0147】

経口投与のための医薬品組成物は、当技術分野でよく知られる医薬上認められる担体を用いて、経口投与に適切な投与量に配合される。このような担体により、医薬品組成物を患者に摂取させるための錠剤、丸剤、糖衣丸、カプセル剤、液体剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁液等に調剤できる。

【0148】

経口投与用の医薬製剤は、有効成分と固形の賦形剤とを配合して、(所望により、粉碎した後に)得られた顆粒の混合物を処理して錠剤或いは糖衣剤コア(dragee core)を作ることによって得られる。必要ならば、適切な添加物が加えることができる。適切な賦形剤には、ラクトース、スクロース、マンニトール或いはソルビトールを含む砂糖のような糖質又はタンパク質賦形剤や、トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモ等からのデンプンや、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース或いはカルボキシルメチルセルロースナトリウムのようなセルロースや、アラビアゴム或いはトラガカントゴムのようなゴムや、並びにゼラチン或いはコラーゲンのようなタンパク質が含まれる。必要ならば、架橋したポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、又はアルギン酸ナトリウムのようなその塩のような崩壊剤又は可溶化剤を加えてもよい。

【0149】

糖衣錠コアは、濃縮糖液のような適切な剤皮と共に用いられるが、それらにはアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポルゲル剤(carbopol gel)、ポリエチレングリコール及び/又はチタンの二酸化物、ラッカー溶液及び適切な有機溶剤或いは溶剤の混合物等が含まれる。錠剤の識別のため、或いは有効

成分の量（即ち投与量）を特徴づけるために、染料或いは色素を錠剤或いは糖衣錠皮に加えることができる。

【0150】

経口投与できる製剤には、ゼラチンからなるプッシュフィット(push-fit)カプセル、ゼラチンからなる軟性のシールされたカプセル及びグリセロール或いはソルビトールのような錠皮が含まれる。プッシュフィットカプセルは、ラクトース或いはデンプンのような賦形剤又は結合剤、タルク或いはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、及び所望により安定剤と混合された有効成分を含みうる。軟性カプセルにおいて、有効成分は、安定剤とともに或いは安定剤なしに、脂肪性の油、液体又は液状ポリエチレングリコールのような適切な液体に溶解或いは懸濁される。

【0151】

非経口投与に適した医薬製剤は、水溶液中で、好適にはハंक溶液、リンゲル溶液或いは生理緩衝食塩水のような生理学的に適合するバッファーの中で配合することができる。水性の注射懸濁液は、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストランのような懸濁液の粘性を高める物質を含みうる。更に、有効成分の懸濁液は、適切な油性注入懸濁液として調製してもよい。適切な親油性の溶媒或いは賦形剤には、胡麻油のような脂肪性の油や、オレイン酸エチル、トリグリセリド或いはリポソームのような合成脂肪酸エステルが含まれる。また非脂質ポリカチオンアミノポリマーが、送達のために用いられる。所望により、懸濁液は化合物の溶解度を増加させて濃縮度の高い溶液の調製を可能にする適切な安定剤又は薬剤を含んでもよい。

【0152】

局所又は経鼻投与用には、浸透する特定の障壁に対して適切な浸透剤が調合に用いられる。このような浸透剤は、当技術分野において周知のものである。

【0153】

本発明の医薬組成物は周知の方法、例えば通常の混合処理、溶解処理、顆粒化処理、糖衣形成処理、湿式粉碎処理(levigating)、乳化処理、カプセル化処理、エントラップ処理(entrapping)或いは凍結乾燥処理により製造される。

この医薬組成物は塩類として提供されることもあり、以下に限定しないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等を含む多くの酸とともに形成することができる。塩は水性或いはプロトニック溶剤において、対応する遊離塩基形態よりも溶解性が高くなる傾向がある。別のケースでは、好適な製剤としては、使用前に緩衝剤配合したpH4.5~5.5の範囲にある1mM~50mMのヒスチジン、0.1%~2%のショ糖、2%~7%のマニトールの何れか、或いは全てを含む凍結乾燥粉末でもよい。

【0154】

医薬組成物は調製された後に適切な容器内に入れられて、指示された状態の治療のためにラベル付けできる。CIRYPの投与の場合では、このようなラベルには、投与量、投与頻度、投与方法が表示される。

【0155】

本発明において使用するのに適する医薬品組成物は、所望の目的を達成するために有効成分を効果的な量だけ含む成分を含んでいる。有効量の決定は、当業者の能力の範囲内で十分行うことができる。

【0156】

任意の化合物の場合、治療に有効な量は、最初は例えばマウス、ウサギ、イヌ、ブタのような動物モデル又は腫瘍性細胞の何れかの細胞培養のアッセイにおいて見積もることができる。また、適切な濃度範囲及び投与経路を決定するために動物モデルを用いることができる。次にこのような情報を利用して、ヒトにおける投与量や投与経路を決定することができる。

【0157】

治療的に有効な量とは、例えば、症状や状態を回復させるCIRYP又はその断片、CIRYPの抗体、CIRYPのアゴニスト、CIRYPのアンタゴニスト、又はCIRYPのインヒビターの有効成分の量を指す。治療的な効力及び毒性は、細胞培養或いは実験動物における標準的な製薬方法により、例えばED₅₀ (母集団の50%における治療的な有効投与量)又はLD₅₀ (母集団の50%の致死投与量)統計量を計算することによって決定することができる。治療効果に対する毒性の用量比が治療指数であり、LD₅₀ / ED₅₀比として表すことができる。医薬品組成物は大きな治療指数を示すこ

とが好ましい。細胞培養のアッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトの使用のための投与量の範囲をまとめるのに用いることができる。そのような成分の投与量は、毒性が少ないか或いは全く毒性がなく、ED₅₀を含む循環する濃度の範囲内にあることが好ましい。使用する剤形、患者の感受性並びに投与経路に応じて、投与量はこの範囲内で変化する。

【0158】

正確な用量は、治療が必要な患者に関連する要因を考慮して医師が決定する。投与及び投薬量は、十分なレベルの有効成分を与える、即ち所定の効果を維持するために調節される。考慮すべき要因としては、疾病状態の重症度、全般的な患者の健康、年齢、体重、性別や、食餌、投与の時間及び頻度や、併用する薬剤、反応感受性、及び治療への反応が含まれる。長時間作用性の医薬品組成物は、半減期及び特定の製剤のクリアランス率に応じて3~4日毎に、1週間毎に、或いは2週間に1度投与してもよい。

【0159】

通常の投与量は0.1~100,000 µgの範囲であり、最大約1gの総投与量まで、投与経路に応じて変化する。特定の投与量或いは送達の方法のガイダンスは文献において提供され、通常当技術分野の医師に利用可能である。当業者は、ヌクレオチドに対しては、タンパク質やインヒビター用の製剤とは異なる製剤を採用することができる。同様に、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの送達は、特定の細胞、状態、位置等に対して特異的でありうる。

【0160】

診断

別の実施例においては、CIRYPに特異的に結合する抗体を、CIRYPの発現によって特徴づけられる疾患の診断や、CIRYP又はCIRYPのアゴニスト、アンタゴニスト若しくはインヒビターで治療を受けている患者のモニタリングのためのアッセイに用いることができる。診断目的に対して有用な抗体は、前述の治療のためのものと同様の方法で作製することができる。CIRYPの診断のアッセイには、ヒトの体液、細胞或いは組織の抽出物においてCIRYPを検出するために抗体及び標識を用いる方法が含まれる。抗体は修飾しても、修飾なしでも用いることができ、ま

た共有結合或いは非共有結合かのいずれかによりリポーター分子と結合させて標識することができる。当業者に周知の多様なリポーター分子が用いられ、そのうちの幾つかについては前述の通りである。

【0161】

ELISA、RIA及びFACSを含む、CIRYPを測定するための種々のプロトコルが当技術分野では周知であり、またこれによりCIRYP発現の変化や異常性のレベルを診断するための基礎が得られる。CIRYPの発現の正常値、即ち標準値は、複合体形成に適した条件下で、哺乳類（例えば、人間の被検者）の正常な患者から得られる体液或いは細胞抽出物とCIRYPの抗体を結合させることによって確立できる。標準の複合体形成量は、測光手段等の種々の方法を用いて定量化できる。患者の生検組織からの対照サンプル及び患部サンプルにおいて発現されたCIRYPの量を、標準値と比較する。標準値と患者の値との偏差によって疾病診断のためのパラメータを確立する。

【0162】

本発明の別の実施例において、CIRYPをコードするポリヌクレオチドを、診断の目的で用いることができる。用いられるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、及びPNAが含まれる。このポリヌクレオチドは、CIRYPの発現が疾病と関連するであろう生検組織における遺伝子発現の検出や定量のために用いられる。診断アッセイは、CIRYPが存在、非存在、過剰発現の何れの状態かを識別したり、治療の処置の際にCIRYPレベルの調節をモニタリングするために用いることができる。

【0163】

一実施態様では、CIRYP又は密接に関連分子をコードする、ゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブとのハイブリダイゼーションを用いて、CIRYPをコードする核酸配列を同定することができる。そのプローブの特異性、つまりそのプローブが非常に高度に特異的な領域（例えば、5'調節領域）に由来するか、或いはより特異性の度合いの低い領域（例えば、保存されたモチーフ）の何れに由来するかによって、またハイブリダイゼーション或いは増幅の（最大の、高い、中程度の、或いは低い）厳密性によって、そのプローブが

CIRYPをコードする自然発生の配列のみを同定するか、或いはアレルや関連する配列も同定するかが決定される。

【0164】

プローブは関連する配列を検出するためにも用いることができ、また好ましくはCIRYPをコードする任意の配列に対して少なくとも50%の配列同一性を有すべきである。本発明のハイブリダイゼーションプローブは、DNA若しくはRNAか、またSEQ ID NO:3-4の配列に由来するものか、或いはCIRYP遺伝子のイントロン、エンハンサー、及びプロモータを含むゲノムの配列に由来するものでもよい。

【0165】

CIRYPをコードするDNAのための特異的なハイブリダイゼーションプローブを製作するための手段には、mRNAプローブを作り出すためにCIRYP又はCIRYP誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をベクターにクローニングする方法がある。このようなベクターは当業者に周知で、また市販されており、適切なRNAポリメラーゼや適切な標識されたヌクレオチドを付加することにより、*in vitro*でRNAプローブを合成するために用いることができる。ハイブリダイゼーションプローブは種々のリポータグループにより標識され、例えば、その標識は、³²Pや³⁵Sのような放射性核種によるものや、アビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合するアルカリホスファターゼのような酵素による標識等である。

【0166】

CIRYPをコードするポリヌクレオチド配列を、CIRYPの発現に関連する疾患の診断のために用いることができる。そのような疾患の例としては、以下に限定はしないが、プロラクチン産生異常や、卵管異常、排卵異常、及び子宮内膜症を含む不妊症や、発情周期の混乱、月経周期の混乱、多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過刺激症候群、子宮内膜や卵巣の腫瘍、子宮筋腫、自己免疫異常、異所的妊娠、及び奇形発生や、乳房の癌、乳房線維嚢胞病及び溢乳や、精子形成の混乱、異常性精子生理、精巣の癌、前立腺の癌、良性の前立腺肥大症、前立腺炎、ペイロニー病(Peyronie's disease)、男性の乳房および女性化乳房の癌等の生殖障害；並びに嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アン

ギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血及び後天性免疫不全症候群（AIDS）の胃腸障害；並びに静座不能、アルツハイマー病、健忘症、筋萎縮性側索硬化、双極性障害、緊張病、脳腫瘍、痴呆、鬱病、糖尿病性ニューロパシー、ダウン症候群、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、てんかん、ハンチントン病、末梢神経疾患、多発性硬化症、神経線維腫症、パーキンソン病、妄想性精神病、帯状疱疹後神経痛、分裂症、季節的感情障害（seasonal affective disorder；SAD）及びトゥレット病等の神経障害；並びに尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ ベッカー型筋ジストロフィ、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱）、スミス マジェニス症候群（Smith- Magenis syndrome）、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、舞蹈病（Sydenham's chorea）及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失等の発生障害が含まれる。CIRYPをコードするポリヌクレオチド配列を、患者の生検組織や体液を利用するサザンブロット法又はノーザン解析、ドットブロット法或いは他の膜をベースとした技術や、PCR技術や、ディップスティック試験法（dipstick）、ピン及びマルチフォーマットELISA様アッセイや、マイクロアレイにおいて用いて、CIRYP発現の変化を検出することができる。このような定性的又は定量的試験法は当業者に周知のものである。

【0167】

特定の態様では、特に上述のような関連疾患の存在を検出するアッセイにおいて、CIRYPをコードするヌクレオチド配列は有用であり得る。CIRYPをコードするヌクレオチド配列を標準的な方法で標識し、またハイブリダイゼーション複合体の形成に適した条件下で、患者からの体液や組織サンプルに加えることができる

。適当なインキュベーション期間の後、そのサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者のサンプルにおけるシグナルの量が、対照サンプルに比べて有意に変化している場合、サンプルのなかのCIRYPをコードするヌクレオチド配列のレベルの変化は、関連する疾患の存在を示している。また、このようなアッセイを用いて、動物実験、臨床試験、又は個々の患者の治療のモニタリングにおける特定の治療学的な処置法の有効性を評価することもできる。

【0168】

CIRYPの発現に関連する疾病の診断のための基礎を提供するために、正常な、即ち標準の発現のプロフィールを確立する。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に適した条件下で、動物又はヒト何れかの正常な患者から採取された体液或いは細胞抽出物をCIRYPをコードする配列又はその断片と結合させることにより達成される。標準のハイブリダイゼーションは、正常な患者から得られる値と、既知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドを用いる実験から得られる値とを比較することにより定量することができる。このように正常なサンプルから得られた標準値は、疾病の徴候がある患者のサンプルから得られる値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾病の存在を証明する。

【0169】

一旦疾患の存在が確認されて治療プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーションアッセイが定期的に繰り返され、患者の発現のレベルが正常な患者で観察されるレベルに近づき始めたか否かを評価できる。連続的なアッセイから得られる結果を用いて、数日から数ヶ月にわたる治療の効果を示すことができる。

【0170】

癌に関しては、個体からの生検組織における異常な量の転写物（不十分若しくは過剰に発現されたもの）の存在が、疾病の発生の素因を示し、つまり実際の臨床的症状が現れる前に疾病を検出するための手段となり得る。このタイプのより決定的な診断により、健康の専門家が予防的処置を講じたり、より早期に積極的な治療を行なうことが可能となり、故に癌の発生や更なる進行を予防することができる。

【0171】

CIRYPをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドの更なる診断のための使用方法には、PCR法の利用が含まれる。これらのオリゴマーは化学的に合成されるか、酵素を用いて作製されるか、或いは*in vitro*で作製されてもよい。オリゴマーは、好ましくはCIRYPをコードするポリヌクレオチドの断片、又はCIRYPをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、特定の遺伝子或いは状態を同定するための最適化された条件の下で用いられる。また密接に関連するDNA又はRNA配列の検出及び/又は定量のために、オリゴマーは緩やかな厳密性の条件で用いることができる。

【0172】

またCIRYP発現を定量するために用いられる方法には、放射標識或いはビオチン化したヌクレオチドの利用、対照核酸の同時増幅(*coamplification*)の利用、及び標準の検量線で補間する実験結果の利用が含まれる(例えば、Melby, P.C.ら(1993) *J. Immunol. Methods*, 159:235-244; Duplaa, C.ら(1993) *Anal. Biochem.* 229-236参照)。多数のサンプルの定量の速度は、目的のオリゴマーが種々の希釈溶液中に存在し、分光光度法又は比色定量応答により迅速に定量するELISA形式のアッセイを実施することによって加速することができる。

【0173】

別の実施例においては、ここに開示した任意のポリヌクレオチド配列に由来するオリゴヌクレオチド又はより長い断片を、マイクロアレイにおける標的として用いることができる。マイクロアレイを用いて、同時に多くの遺伝子の発現レベルをモニタし、また遺伝子の変異配列、変異及び多形性を同定することができる。この情報は、遺伝子機能の決定、疾病の遺伝的基礎の理解、疾病の診断、並びに治療薬の開発及びその活性のモニタリングにおいて有用である。

【0174】

マイクロアレイを準備して、それを用いて当業者に周知の方法で分析してもよい(例えば、Brennan, T.M.ら(1995) U.S. Patent NO. 5,474,796; Schena, M.ら(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:10614-10619; Baldeschweilerら(1995) PCT application W095/251116; Shalom D.ら(1995) PCT application W095/35505; Heller, R.A.ら(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:2150-2155; 並びにHel

ler. M.J.ら(1997) U.S. Patent No.5,605,662を参照)。

【0175】

本発明の別の実施例においては、CIRYPをコードする核酸配列を用いて、自然発生のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作り出すことができる。この配列は、特定の染色体、染色体の特定の部分、又は人工染色体作製物にマッピングすることができ、その人工染色体作製物には、例えば、ヒト人工染色体(HACs)、酵母菌人工染色体(YACs)、細菌人工染色体(BACs)、細菌性P1作製物又は一本鎖染色体cDNAライブラリがある(例えば、Harrington. J.J.ら(1997) Nat Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134; 並びにTrask. B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154を参照)。

【0176】

蛍光性in situハイブリダイゼーション(FISH)は、他の物理的な染色体マッピング技術や遺伝地図データと関連し得る(例えば、Heinz-Ulrichら(1995) in Meyers, 前出, pp.965-968を参照)。遺伝地図データの例は、種々の科学誌、又はOnline Mendelian Inheritance in Man(OMIM) World Wide Webサイトに見られる。物理的な染色体地図上のCIRYPをコードする配列の位置及び特定の疾病、若しくは特定の疾病の素因との関連性が、疾患に関係するDNAの領域の範囲を定めるのに役立つ。本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者とキャリア、また発症した個体との間の遺伝子配列の違いを検出することができる。

【0177】

遺伝地図を拡大するために、染色体作製物のin situハイブリダイゼーション及び確立された染色体マーカーを用いる連鎖解析のような物理的マッピング技術を用いることができる。多くの場合、特定のヒト染色体の数やアームが未知であっても、マウスのような別の哺乳類の染色体上の遺伝子配置によって関連するマーカーが明らかになる。物理的マッピングによって、新たな配列を染色体のアーム、或いはその一部へ割当てることができる。これにより、位置クローニング又は別の遺伝子発見技術を用いて、疾病遺伝子を検索する研究者に価値ある情報を提供できる。ひとたび疾患或いは症候群が、特定のゲノム領域(例えば、11q22-

23に対する毛細血管拡張性運動失調) への遺伝連鎖による不完全な位置ぎめがなされると、その領域にマッピングされる任意の配列は、さらなる研究のための関連する遺伝子又は調節遺伝子を表し得る (例えば、Gatti, R.A.ら (1988) Nature 336:577-580参照)。また、本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者の染色体の位置と、キャリア、又は発症した個体の、転座、逆位等によって生じた染色体の位置との違いを検出することもできる。

【0178】

本発明の別の実施例においては、CIRYPや、その触媒作用性又は免疫原性断片、又はそれらのオリゴペプチドを、種々の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングのために用いることができる。そのようなスクリーニングにおいて用いられる断片は、溶液中で遊離しているか、固体支持体へ付着しているか、細胞表面へ付着しているか、或いは細胞内に位置しているものであり得る。CIRYPと試験する薬剤との結合複合体の形成を測定することができる。

【0179】

別の薬物スクリーニング技術によって、目的のタンパク質に対する適切な結合親和性を有する化合物の高スループットスクリーニングが提供される (例えば、Geysenら (1984) PCT出願W084/03564参照)。この方法においては、多くの異なる小形の試験化合物が固体基板において合成される。試験化合物をCIRYP又はその断片と反応させ、そして洗浄する。次に、当技術分野で周知の方法で結合CIRYPを検出する。また、前述の薬物スクリーニング技術において使用するために、精製されたCIRYPをプレート上に直接コーティングすることもできる。或いは、非中和性抗体を用いて、ペプチドを捕捉して固体支持体上に固定することができる。

【0180】

別の実施例においては、CIRYPの結合のためにCIRYPと結合可能な中和抗体が試験化合物と特異的に競合する競合的薬物スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法において、抗体を用いて、1以上の抗原決定基をCIRYPと共有する任意のペプチドの存在を検出することができる。

【0181】

更に別の実施例においては、その新技術が、以下に限らないが、トリプレット遺伝暗号及び特異的な塩基対相互作用のようなものを含め現在周知のヌクレオチド配列の特性に基づくものであれば、CIRYPをコードするヌクレオチド配列を、未だ開発されていない分子生物学的技術に用いることができる。

【0182】

当業者は、更なる説明がなくても前述の説明によって本発明を十分に利用できるであろう。従って、以下に記す特定の好適実施例は、単なる例示であって本発明を限定するものではない。

【0183】

本明細書に記載した全ての特許出願、特許、刊行物、並びに米国特許出願 [代理人明細書番号PF-0659P (1999年1月15日出願)] については、ここで言及することにより本明細書の一部とする。

【0184】

【実施例】

1 cDNAライブラリの作製

DUODNOT01 cDNAライブラリは、41歳の白人女性の根治的膵十二指腸切除術の際に採取された十二指腸組織から単離したRNAを用いて作製した。家族歴には、良性の高血圧症及び皮膚腫瘍が含まれていた。

【0185】

UTRSNOT02 cDNAライブラリは、34歳の白人女性の膣式子宮摘出術の際に採取された子宮組織から単離したRNAを用いて作製した。患者の病歴には、僧帽弁障害が含まれていた。家族歴には、胃癌、先天性心臓異常、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、大腸癌、脳血管障害、II型糖尿病及びうつ病が含まれていた。

【0186】

RNAはClontech社から購入したものが、前述の組織から単離したものである。幾つかの組織を均質化してグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解し、一方では別の組織をホモジナイズしてフェノールに溶解するか、或いはTRIZOL (Life Technologies)、グアニジニウムイソチオシアネート及びフェノールの单相溶

液等の適切な変性剤の混合液に溶解した。結果として得られた溶解産物をCsClクッションでの遠心分離またはクロロホルムで抽出した。イソプロパノール或いは酢酸ナトリウムの何れかとエタノールで、或いは別の通常の方法でこの溶解物からRNAを沈殿させた。

【0187】

RNAのフェノール抽出および沈殿を必要な回数繰り返してRNAの純度を高めた。場合によっては、RNAをDNA分解酵素で処理した。殆どのライブラリでは、oligo d(T)結合常磁性粒子 (Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子 (QIAGEN, Chatsworth CA)、又はOLIGOTEX mRNA精製キット (QIAGEN) を用いてpoly(A+) RNAを単離した。或いは、例えばPOLY(A)PURE mRNA精製キット (Ambion, Austin TX) 等の別のRNA単離キットを用いてRNAを組織溶解産物から直接単離した。

【0188】

場合によっては、Stratagene社にRNAを提供してそれに対応するcDNAライブラリを作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) 又はSUPERSCRIPトプラスミドシステム (Life Technologies) を用いて当業者に周知の推奨された方法もしくは類似の方法でcDNAを合成してcDNAライブラリを作製した。(例えば、Ausubel, 1997, 前出, units 5.1-6.6を参照)。oligo d(T)又はランダムプライマーを用いて逆転写を開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプタを2本鎖cDNAに結合させてから、適切な(複数の)制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリでは、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2B、若しくはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィ (Amersham Pharmacia Biotech)、又は分離用のアガロースゲル電気泳動法によってcDNAの大きさ(300~1000bp)を選択した。適切なプラスミド(例えば、PBLUESCRIPトプラスミド(Stratagene)、PSPORT1プラスミド(Life Technologies)、又はpINCY(Incyte Pharmaceuticals)等)のポリリンカーの適合性制限酵素部位にcDNAを結合させた。組換えプラスミドを、例えば、XL1-Blue、XL1-BlueMRF若しくはSOLR (Stratagene)、又はDH5、DH10B若しくはElectroMAX DH10B (Life Technologies) 等のコンピテントE.coli細胞に形質転換した。

【0189】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) 又は細胞溶解を利用して、in vivoでの切除によって宿主細胞からプラスミドを回収した。Magic若しくはWIZARD Mini preps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、及びQIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid、QIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム又はREAL Prep 96プラスミドキット (QIAGEN) のうちの少なくとも1つを用いてプラスミドを精製した。沈殿の後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4 で保管した。

【0190】

或いは、高スループットフォーマットの直接結合PCR法によって宿主細胞溶解産物からプラスミドDNAを増幅した (Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程を単一反応混合液で実施した。サンプルを処理して384-ウエルプレートで保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 及びFluoroskan II蛍光スキャナー (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) を用いて蛍光定量的に測定した。

【0191】

3 配列決定及び分析

cDNAシーケンシング反応は、標準的な方法或いはABI CATALYST 800 (Perkin-Elmer) thermal cycler若しくはPTC-200 thermal cycler (MJ Research) 等の高スループットの機器とHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) 若しくはMICROLAB 2200 (Hamilton) liquid transfer systemとを共に用いて処理した。cDNAシーケンシング反応は、Amersham Pharmacia Biotech社によって提供された試薬か、又はABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer) のようなABIシーケンシングキットに供給された試薬を用いて準備した。cDNAシーケンシング反応の電気泳動的な分別及び標識したポリヌクレオチドの検出は、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics) ; ABI PRISM 373若しくは377シーケンシングシステム

ム (Perkin-Elmer) と標準的なABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアとの組合せ; 又は当業者に周知の他の配列分析システムを用いて実施した。cDNA配列中の読み枠は、標準的な方法を用いて識別した (Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7のレビュー)。cDNA配列の幾つかを選択して、本実施例の5に記載した方法で伸長した。

【0192】

周知のアルゴリズムを利用するソフトウェアプログラムを組合せて用いて、cDNAシーケンシングから得られたポリヌクレオチド配列を構築及び分析した。表1は、利用したツール、プログラム、及びアルゴリズムの概要、並びに適切な説明、引用文献、及び閾値パラメータを示す。表1の第1列は用いたツール、プログラム、及びアルゴリズムであり、第2列はそれらの簡単な説明であり、第3列は引用文献 (それらの全てはここで言及することにより本明細書の一部とする) であり、第4列は2つの配列間の一致の程度の評価に用いた適切なスコア、確率値、及び他のパラメータである (スコアが高いほど2つの配列間の相同性が高い)。配列は、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) 及びLASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて分析した。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アライメントは、整列した配列間の同一性%を計算するMEGALIGNマルチシーケンス・アライメント・プログラム (DNASTAR) に組込まれたclustalアルゴリズムによって指定されたデフォルトのパラメータを用いて作成した。

【0193】

ポリヌクレオチド配列の確証は、BLAST、動的計画法及びジヌクレオチド最近接分析に基づいたプログラム及びアルゴリズムを用いて、ベクター、リンカー及びポリA配列を取除き、多義性の塩基対をマスクすることによって実施した。次に、配列をBLAST、FASTA及びBLIMPSに基づくプログラムを用いてGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物及び真核生物のデータベースや、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAM等の公共のデータベースでから選択した配列に対して問合わせて注釈を得た。Phred、Phrap及びConsedに基づくプログラムを用いて配列を完全長のポリヌクレオチドに構築し、GeneMark、BLAST及びFASTAに基づいた

プログラムを用いて読み枠にスクリーニングした。完全長のポリヌクレオチド配列を翻訳して対応する完全長のアミノ酸配列を引き出し、続いてその完全長のポリヌクレオチド配列をGenBankデータベース(前述)、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM、Prosite及び隠れマルコフモデル(HMM)に基づくPFAMなどのタンパク質ファミリーデータベースに問い合わせることによって分析した。HMMは、遺伝子ファミリーの共通一次構造を解析する確率的アプローチである(例えば、Eddy, S.R. (1996) Cur. Opin. Str. Biol. 6:361-365を参照)。

【0194】

完全長のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の構築及び分析のための上述のプログラムは、SEQ ID NO:3-4からのポリヌクレオチド配列の断片の同定にも使用した。ハイブリダイゼーション及び増幅に有用な約20から約4000までのヌクレオチドの断片については、前述の「発明」の部分で説明した。

【0195】

4 ノーザン解析

ノーザン解析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織に由来するRNAが結合しているメンブレンと、標識されたヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションに関わる(例えば、Sambrookら、前出、ch.7;並びにAusubel, F.M.ら前出、ch.4及び16参照)。

【0196】

BLASTを使用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBank或いはLIFESEQ (Incyte Pharmaceuticals)等のヌクレオチドデータベース内の同一或いは関連する分子を検索する。この分析は、多くのメンブレンをベースとしたハイブリダイゼーションに比べてより高速である。さらにコンピュータ検索の感度を変更して、任意の特定の一致が、厳密な一致或いは類似の何れとして分類されるかを決定することができる。検索の基準は、以下で定義される積スコア(product score)である。

$$(\text{配列一致}\% \times \text{最大BLASTスコア}\%) / 100$$

積スコアは、2つの配列間の類似の程度及び配列一致の長さの両方を考慮に入れる。例えば、積スコア40の場合、その一致は1~2%誤差の範囲内の正確さであり、

積スコア70の場合は正確な一致となる。類似の分子は通常15~40間の積スコアを示す分子を選択することにより同定されるが、それより低いスコアでは関連した分子として同定される。

【0197】

ノーザン解析の結果は、CIRYPをコードする転写物が発生したライブラリの割合の分布として報告される。分析には、器官/組織及び疾患によるcDNAライブラリの分類が含まれる。器官/組織の分類には、心血管、皮膚、発生、内分泌、胃腸、造血/免疫、筋骨格、神経、生殖及び泌尿器が含まれる。疾病/症状の分類には、癌、炎症/心的外傷、細胞増殖、神経及び貯留(pooled)が含まれる。各カテゴリーについて、目的の配列を発現するライブラリを数えて、カテゴリー全体にわたるライブラリの合計数で割った。各組織に特異的な発現ならびに疾病、疾患若しくは症状に特異的な発現の割合を「発明」の説明に示した。

【0198】

5 CIRYPをコードするポリヌクレオチドの伸長

SEQ ID NO:3-4の完全長の核酸配列は、完全長分子の適切な断片を伸長してこの断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'の伸展を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の伸展を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)或いは他の適切なプログラムを用いて、約22~30個のヌクレオチドからなる長さであって50%以上のGC含有物を有し、且つ約68~72の温度で標的配列にアニーリングするようにcDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー2量体を生ずるようなヌクレオチドの如何なる伸長も回避した。

【0199】

選択されたヒトcDNAライブラリを用いてこの配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要であるか、又は望ましい場合には、プライマーの付加的な或いは入れ子の(nested)組を設計する。

【0200】

当業者に周知の方法を利用したPCR法で高い忠実度の増幅を実施した。PCRは、

PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.) 用いて96ウェルプレートにおいて行った。反応混合液には、DNA鋳型、200nmolの各プライマーと、 Mg^{2+} 、 $(NH_4)_2SO_4$ 及びβ-メルカプトエタノールを含む反応緩衝液と、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) と、ELONGASE酵素 (Life Technologies) と、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) とが含まれる。プライマーの組PCI A及びPCI B に対して以下のパラメータを用いた。

- ステップ1 94 で3分間
- ステップ2 94 で15秒
- ステップ3 60 で1分間
- ステップ4 68 で2分間
- ステップ5 ステップ2、3、及び4を20回繰り返す
- ステップ6 68 で5分間
- ステップ7 4 で保管

或いは、プライマーの組T7及びSK+に対して以下のパラメータを用いた。

- ステップ1 94 で3分間
- ステップ2 94 で15秒
- ステップ3 57 で1分間
- ステップ4 68 で2分間
- ステップ5 ステップ2、3、及び4を20回繰り返す
- ステップ6 68 で5分間
- ステップ7 4 で保管

各ウェルのDNA濃度は、0.5μlの希釈していないPCR生成物及び1X TEに溶解した100μlのPICOGREEN定量試薬 (0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) を不透明な蛍光光度計プレート (Coming Costar, Acton MA) の各ウェルに分配し、DNAが試薬と結合可能なようにして測定した。このプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) でスキャンして、サンプルの蛍光を計測し、またDNA濃度を定量化する。反応混合物の5~10μlの一定分量を1%のアガロースミニゲル上での電気泳動法によって解析し、何れの反応物が配列の伸長に成功したかを決定する。

【0201】

伸長したヌクレオチドを脱塩及び濃縮し、384ウェルプレートに移し、CviJIコ
レラウィルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI)
で消化し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) に再連結する前に音
波処理又はせん断を実施した。ショットガン配列決定のために、消化したヌクレ
オチドを低濃度 (0.6~0.8%) のアガロースゲル上に分離し、断片を切除し、寒
天をAgar ACE (Promega) で消化した。伸長したクローンをT4リガーゼ (New Eng
land Biolabs, Beverly MA) を用いてpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Bio
tech) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で処理して制限部位の
オーバーハングを満たし、更にコンピテントE.coli細胞に形質移入した。形質移
入した細胞を抗生物質を含む培地において選択し、個々のコロニーを選択してLB
/2X carb培養液の384ウェルプレートに37 で終夜培養した。

【0202】

細胞を溶解し、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) 及びPfu
DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いて以下のパラメータでDNAをPCR増幅した

- ステップ1 94 で3分間
- ステップ2 94 で15秒
- ステップ3 60 で1分間
- ステップ4 72 で2分間
- ステップ5 ステップ2、3、及び4を29回繰り返す
- ステップ6 72 で5分間
- ステップ7 4 で保管

前述のようにPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) でDNAを定量化した。DNA回収
率の低いサンプルは、上記の条件で再度増幅した。サンプルを20%のジメチルス
ルホキシド(dimethylsulphoxide) (1:2, v/v) で希釈し、DYENAMIC energy trans
fer sequencingプライマー並びにDYENAMIC DIRECTキット (Amersham Pharmacia
Biotech) 若しくはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reac
tion kit (Perkin-Elmer) を用いて配列決定した。

【0203】

同様に、SEQ ID NO:3-4のヌクレオチド配列を使用し、上記手順、5'伸長用に設計されたオリゴヌクレオチド、及び適切なゲノムライブラリを用いて5'調節配列が得られる。

【0204】

6 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用

SEQ ID NO:3-4から得られたハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、ゲノムDNA又はmRNAをスクリーニングする。約20の塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片にも概ね同じ手順を用いる。オリゴヌクレオチドを、OLIGO4.06ソフトウェア (National Biosciences) のような当技術分野のソフトウェアを用いて設計し、50pmolの各オリゴマー、250 µCiの[⁻³²P]アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) を結びつけることにより標識する。標識されたオリゴヌクレオチドを、SEPHADEX G-25超微細分子サイズ排除デキストランビーズカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。毎分10⁷カウントの標識されたプローブを含むアリコットを、以下のエンドヌクレアーゼ、即ちAse I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba1又はPvu II (DuPont NEN) の中の1つで消化されたヒトゲノムDNAの典型的なメンブレンに基づくハイブリダイゼーション解析に用いる。

【0205】

各消化物からのDNAを、0.7%アガロースゲルに上で分画して、ナイロンメンブレン (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは40℃で16時間かけて実施する。非特異的シグナルを除去するために、0.1xクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムまでの徐々に厳密性を増す条件下で、プロットを室温にて順次洗浄する。ハイブリダイゼーションパターンをオートラジオグラフィー若しくは代替イメージング手段を用いて視覚化して比較する。

【0206】

7 マイクロアレイ

化学的結合プロシージャ及びインクジェット装置を用いることにより、基板の表面上でアレイエレメントを合成することができる。(例えば、Balteschweiler, 前出参照)。また、ドットプロット又はスロットプロット法に類似の所定のアレイを用いて、熱、UV、化学的若しくは機械的結合プロシージャを利用して、基板の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。標準的なアレイは、手製で或いは手近な方法及び機械を用いて製作でき、また任意の適切な数のエレメントを含む。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしていないプローブを取除き、スキャナーを用いて蛍光のレベル及びパターンを判定する。マイクロアレイ上のエレメントとハイブリダイズする各プローブの相補性の度合及び相対的な存在量は、スキャナーで読取られた画像を解析することにより評価する。

【0207】

完全長cDNA、発現された配列タグ(EST)、又はそれらの断片は、マイクロアレイのエレメントを含み得る。ハイブリダイゼーションに適した断片は、当業者に周知のLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)のようなソフトウェアを用いて選択可能である。本発明のヌクレオチド配列の1つに対応する完全長cDNA、EST、若しくはそれらの断片を、又は本発明に関連するcDNAライブラリから無作為に選択されたものを、例えばスライドガラスのような適切な基板に配置する。そのcDNAを、例えばUV架橋の後に熱的及び化学的に処置し、さらに乾燥することによって、スライドガラスに固定する(例えば、Schena, M.ら(1995) Science 270:467-470; 並びにShalon, D.ら(1996) Genome Res. 6:639-645参照)。蛍光プローブを作製し、基板上のエレメントとのハイブリダイゼーションに用いる。基板は前述の方法によって解析する。

【0208】

8 相補的ポリヌクレオチド

CIRYPをコードする配列に相補的な配列、或いはその任意の一部を、自然発生CIRYPの発現を検出し、低下させる、即ち抑制するために用いる。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記載するが、より小さな、或いはより大きな配列フラグメントの場合でも本質的に同じ方法が用いられる。OLIGO 4.06ソフトウェア及びCIRYPのコーディング配列を用いて適切なオリゴヌクレオチド

を設計する。転写を抑制するために、相補オリゴヌクレオチドを最も独特な5'配列から設計してコーディング配列へのプロモーターの結合を防止するために用いる。翻訳を抑制するために、相補的なオリゴヌクレオチドを設計してCIRYPをコードする転写物へのリボソームの結合を防ぐ。

【0209】

9 CIRYPの発現

CIRYPの発現及び精製は、細菌又はウイルスに基づく発現系を用いて実施される。細菌におけるCIRYPの発現の場合、抗菌性の耐性遺伝子とcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターとを含む適切なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターの例としては、以下に限定しないが、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5又はT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが挙げられる。組換えベクターを、BL21(DE3)などの適切な細菌性の宿主に形質転換する。抗生物質耐性菌が、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)での誘発によりCIRYPを発現する。真核生物の細胞におけるCIRYPの発現は、昆虫又は哺乳動物の細胞株に、一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多角体ウイルス(AcMNPV)を感染させることによって行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同的組換え又は転移プラスミド中間体を含む細菌媒介の遺伝子転移の何れかによって、CIRYPをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強力なポリヘドリンプロモータによって高レベルのcDNAの転写が行われる。多くの場合、組換え型バキュロウイルスは、Spodoptera frugiperda(Sf9)昆虫細胞の感染に用いられるが、場合によっては、ヒト肝細胞の感染にも用いられる。後者の感染には、バキュロウイルスに対する更なる遺伝的変更が必要となる。(例えば、Engelhard, E. K.ら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 91:3224-3227; Sandig, V.ら(1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945を参照)。

【0210】

殆どの発現系において、CIRYPは、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、又はFLAG若しくは6-His等のペプチドエピトープ標識で融合タンパク質として合成され、粗製の細胞溶解物からの組換え型融合タンパク質の親和性ベース

の精製を迅速に1段階で行うことができる。*Schistosoma japonicum*からの26キロダルトンの酵素のGSTによって、タンパク質の活性及び抗原性を維持した条件下で固定化されたグルタチオにおける融合タンパク質の精製が可能となる (Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後に、特定の操作部位においてCIRYPからGST部分をタンパク分解的に切断可能である。8個のアミノ酸のペプチドであるFLAGにより、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体を用いて免疫親和性の精製が可能となる (Eastman Kodak)。6個の連続したヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂 (QIAGEN) における精製が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法については、Ausubelが (1995年, 前出, ch 10 and 16) 論じている。これらの方法によって得られた精製されたCIRYPを、以下のアッセイで直接用いることができる。

【0211】

1.0 CIRYP活性の実証

電気泳動度シフトアッセイ (electro mobility shift assay; EMSA) によって、明と暗の状態の変化に応じたCIRYPの転写の活性化を測定することによってCIRYPの活性を実証する。EMSAをDNA-タンパク質複合体の検出に用いて、放射性標識の或いは化学的に標識したDNA配列を特定のタンパク質と共にインキュベートすることができる。結果として得られた複合体をポリアクリルアミドゲル上で分離し、オートラジオグラフィで可視化した。動物を絶えず暗い場所においた場合、所定の概日リズム関連遺伝子のプロモータ領域に対するDNA結合活性が低下する。従って、CIRYPのプロモータ領域に対する転写活性化因子の結合は、光に対する露出の量に応じて異なると予想され、それはCIRYP活性に直接的に比例する。

【0212】

1.1 機能的アッセイ

CIRYPの機能は、哺乳類細胞培養系における生理学的に高められたレベルでのCIRYPをコードする配列の発現によってアッセイする。高レベルでcDNAを発現する強力なプロモーターを含む哺乳類の発現ベクターにcDNAをサブクローニングする。選り抜きのベクターには、pCMV SPORT (Life Technologie) 及びpCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) が含まれ、その各々にはサイトメガロウイルスプロモ

ーターが含まれる。5～10 μ gの組換えベクターを、リポソーム製剤或いは電気穿孔法によって、例えば内皮若しくは造血細胞株に瞬間的に形質移入する。また、標識タンパク質をコードする配列を含む1～2 μ gの付加的なプラスミドを同時形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入された細胞と形質移入されていない細胞とを区別することができ、また組換えベクターからのcDNAの発現を確実に予測できる。選り抜きの標識タンパク質には、緑色蛍光タンパク質（GFP；Clontech）、CD64、又はCD64-GFP融合タンパク質が含まれる。自動化されたレーザー光学に基づいた技術であるフローサイトメトリー（FCM）を用いて、GFP又はCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、また細胞の特性（例えば、アポトーシスの状態）を評価する。FCMによって、先行する或いは同時の細胞死の現象を診断する蛍光分子の取込みを検出及び定量化する。これらの現象には、プロピジウムヨウ化物でのDNAの染色によって測定される核DNA内容物の変化、プロモデオキシウリジンの取込み量の低下によって測定されるDNA合成の下方制御、特異的抗体との反応性によって測定される細胞表面及び細胞内のタンパク質の発現の変化、並びにフルオレセイン結合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって測定される原形質膜組成の変化が含まれる。フローサイトメトリーの方法については、Ormerod, M. G.の(1994) Flow Cytometry, Oxford, New York, NYに記載されている。

【0213】

遺伝子発現におけるCIRYPの影響は、CIRYPをコードする配列並びにCD64若しくはCD64-GFPの何れかが形質移入された高度に精製された細胞集合を用いて評価することができる。CD64及びCD64-GFPは、形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG（IgG）の保存された領域と結合する。形質転換された細胞を、ヒトIgG若しくはCD64の抗体の何れかで被覆された磁気ビーズを用いて、形質転換されていない細胞から分離することができる（DYNAL, Lake Success, NY）。mRNAは、当業者に周知の方法で細胞から精製することができる。CIRYP及び目的とする他の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン解析やマイクロアレイ技術で解析することが可能である。

【0214】

1.2 CIRYP特異的抗体の産生

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE ; 例えば、Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 182:488-495参照)、或いは他の精製技術を使用して実質的に精製されたCIRYPを用いて、標準的なプロトコルに従ってウサギを免疫化して抗体を生成する。

【0215】

或いは、CIRYPのアミノ酸配列をLASERGENE software (DNASTAR) を用いて解析して免疫原性の高い領域を判定し、対応するオリゴポリペプチドを合成し、これを用いて当業者に知られた方法により抗体を産生させる。C-末端付近又は親水性領域内のエピトープのような適切なエピトープの選択方法の詳細については当業者の文献に記載されている (例えば、Ausubel, 1995, 前出, ch.11参照)。

【0216】

通常、15残基の長さのオリゴペプチドを、fmoc法の化学作用を利用するABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin-Elmer) を用いて合成し、MBS (N-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) を用いた反応によりKLH(Sigma, St.Louis, MO)に結合させて免疫抗原性を増強させる (例えば、Ausubel前出 参照)。ウサギをフロイント完全アジュバントにおけるオリゴペプチド-KLH複合体で免疫化する。その結果生じる抗血清は、例えば、プラスチックにペプチドを結合させ、1% BSAでブロッキングし、ウサギ抗血清と反応させ、洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させることにより、抗ペプチド活性に対して検査される。

【0217】

1.3 特異的抗体を用いる天然のCIRYPの精製

CIRYPに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより、天然或いは組換えCIRYPを実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CIRYP抗体を、CNBr-活性化セファロース (Amersham Pharmacia Biotech) のような活性化されたクロマトグラフィ用樹脂に共有結合させることにより作製する。結合の後、製造者の取扱説明書に従って樹脂をブロック及び洗浄する。

【0218】

CIRYPを含む培養液をイムノアフィニティーカラムに通し、CIRYPを優先的に吸着させる条件下（例えば、界面活性剤の存在下における高イオン強度のバッファ－）でそのカラムを洗浄する。抗体/CIRYP結合を分裂させる条件下（例えば、pH2~3のバッファ－、又は尿素若しくはチオシアン酸塩イオンのような高濃度のカオトロープ(chaotrope)）でカラムを溶出させ、CIRYPを回収する。

【0219】

1.4 CIRYPと相互作用する分子の同定

¹²⁵I Bolton-Hunter試薬を用いて、CIRYP或いはその生物学的に活性な断片を標識する（例えば、Bolton A.E. 及びW. M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539）。マルチウエルプレートのウエル内に予め配置した候補分子を、標識したCIRYPと共にインキュベートし、洗浄し、標識したCIRYP複合体を有する任意のウエルをアッセイする。種々のCIRYP濃度で得られたデータを用いて、CIRYPと候補分子との結合、親和性及び数についての値を計算する。

【0220】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本明細書に記載した方法及びシステムの種々の改変を行うことができるであろう。本発明を特定の好適実施例に関して説明してきたが、請求する発明がそのような特定の実施例に過度に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、記載した本発明の実施のための方法の種々の改変は、分子生物学或いは関連する分野の当業者には明らかであり、請求の範囲内に含まれることを意図するものである。

【0221】

表の簡単な説明

表1には、CIRYPの解析に用いたツール、プログラム及びアルゴリズム並びに適切な説明、引用文献及びパラメーター閾値を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.
 HILLMAN, Jennifer L.
 TANG, Y. Tom
 LU, Dyung Aina M.
 AZIMZAI, Yalda

<120> PROTEINS ASSOCIATED WITH CIRCADIAN RHYTHMS

<130> PF-0659 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 09/231,160; unassigned
 <151> 1999-01-15

<160> 6

<170> PERL Program

<210> 1
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1581473CD1

<400> 1
 Met Ala His Arg Leu Gln Ile Arg Leu Leu Thr Trp Asp Val Lys
 1 5 10 15
 Asp Thr Leu Leu Arg Leu Arg His Pro Leu Gly Glu Ala Tyr Ala
 20 25 30
 Thr Lys Ala Arg Ala His Gly Leu Glu Val Glu Pro Ser Ala Leu
 35 40 45
 Glu Gln Gly Phe Arg Gln Ala Tyr Arg Ala Gln Ser His Ser Phe
 50 55 60
 Pro Asn Tyr Gly Leu Ser His Gly Leu Thr Ser Arg Gln Trp Trp
 65 70 75
 Leu Asp Val Val Leu Gln Thr Phe His Leu Ala Gly Val Gln Asp
 80 85 90
 Ala Gln Ala Val Ala Pro Ile Ala Glu Gln Leu Tyr Lys Asp Phe
 95 100 105
 Ser His Pro Cys Thr Trp Gln Val Leu Asp Gly Ala Glu Asp Thr
 110 115 120
 Leu Arg Glu Cys Arg Thr Arg Gly Leu Arg Leu Ala Val Ile Ser
 125 130 135
 Asn Phe Asp Arg Arg Leu Glu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly Leu
 140 145 150
 Arg Glu His Phe Asp Phe Val Leu Thr Ser Glu Ala Ala Gly Trp
 155 160 165

```

Pro Lys Pro Asp Pro Arg Ile Phe Gln Glu Ala Leu Arg Leu Ala
      170                      175                      180
His Met Glu Pro Val Val Ala Ala His Val Gly Asp Asn Tyr Leu
      185                      190                      195
Cys Asp Tyr Gln Gly Pro Arg Ala Val Gly Met His Ser Phe Leu
      200                      205                      210
Val Val Gly Pro Gln Ala Leu Asp Pro Val Val Arg Asp Ser Val
      215                      220                      225
Pro Lys Glu His Ile Leu Pro Ser Leu Ala His Leu Leu Pro Ala
      230                      235                      240
Leu Asp Cys Leu Glu Gly Ser Thr Pro Gly Leu
      245                      250

```

```

<210> 2
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2267905CD1

```

```

<400> 2
Met Ser Cys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Pro Arg Leu Trp Arg Leu
  1      5      10
Arg Pro Gly Ala Arg Arg Ser Leu Ser Ala Tyr Gly Arg Arg Thr
      20      25      30
Ser Val Arg Phe Arg Ser Ser Gly Met Thr Leu Asp Asn Ile Ser
      35      40      45
Arg Ala Ala Val Asp Arg Ile Ile Arg Val Asp His Ala Gly Glu
      50      55      60
Tyr Gly Ala Asn Arg Ile Tyr Ala Gly Gln Met Ala Val Leu Gly
      65      70      75
Arg Thr Ser Val Gly Pro Val Ile Gln Lys Met Trp Asp Gln Glu
      80      85      90
Lys Asp His Leu Lys Lys Phe Asn Glu Leu Met Val Met Phe Arg
      95     100     105
Val Arg Pro Thr Val Leu Met Pro Leu Trp Asn Val Leu Gly Phe
     110     115     120
Ala Leu Gly Ala Gly Thr Ala Leu Leu Gly Lys Glu Gly Ala Met
     125     130     135
Ala Cys Thr Val Ala Val Glu Glu Ser Ile Ala His His Tyr Asn
     140     145     150
Asn Gln Ile Arg Thr Leu Met Glu Glu Asp Pro Glu Lys Tyr Glu
     155     160     165
Glu Leu Leu Gln Leu Ile Lys Lys Phe Arg Asp Glu Glu Leu Glu
     170     175     180
His His Asp Ile Gly Leu Asp His Asp Ala Glu Leu Ala Pro Ala
     185     190     195
Tyr Ala Val Leu Lys Ser Ile Ile Gln Ala Gly Cys Arg Val Ala
     200     205     210
Ile Tyr Leu Ser Glu Arg Leu
     215

```

<210> 3
 <211> 1294
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1581473CB1

<400> 3
 ttctgctca ggtccgggct cctggacttc gcctttcccg agccctggag gtggggagaa 60
 aaggttcacc aatttttaaa atccaaatat atctcatggt acagtggaag aactggccag 120
 agagctctgga agtttgggtt ctggctcctgg ctgtgccact gactcactgt gaccttggga 180
 tcttgtgctg tgaagacatt tcccaagtgc ttcattgttag ccagcaaatc tgaccacaaa 240
 ggcctggaaa gaggtgattg ttaggttgcg cagaggtggt cttatccagc tcagcttccc 300
 ctgggaccca ccgtgggacc tgaggcagaa ctggggtgga cttggcctcc tccatggcac 360
 accggctgca gatacactg ctgacgtggg atgtgaagga cacgctgctc aggctcogcc 420
 accccttagg ggaggcctat gccaccaagg ccggggccca tgggctggag gtggagccct 480
 cagccctgga acaaggcttc aggcaggcat acagggctca gagccacagc tcccccaact 540
 acggcctgag ccaecggccta acctcccgcc agtggctggc ggatgtggtc ctgcagacct 600
 tccacctggc ggggtgtccag gatgctcagg ctgtagcccc catcgtgaa cagctttata 660
 aagacttcag ccaccctgc acctggcagg tgttggatgg ggctgaggac accctgaggg 720
 agtgccgcac acggggtctg agactggcag tgatctccaa ctttgaccga cggctagagg 780
 gcactcctggg gggccttggc ctgctgtaac acttcgactt tgtgctgacc tccgaggtg 840
 ctggctggcc caagccggac ccccgcatct tccaggaggc cttgctgctt gctcatatgg 900
 aaccagttagt ggcagcccat gttggggata attacctctg cgattaccag gggcctcggg 960
 ctgtgggcat gcacagcttc ctgggtggtg gcccacaggc actggacccc gtggtcaggg 1020
 attctgtacc taaagaacac atcctcccct ctctggccca tctcctgctt gccctgact 1080
 gcctagaggg ctcaactcca gggctttgag gccagtgagg gaagtggctg ggccctaggg 1140
 catggagaaa accttaaaaca aaccctggag acagggagcc ctttctttct ccacagctct 1200
 ggaccttccc ccctctcccct ggggcctttg tcacctactg tgataataaa gcagtgagtg 1260
 ctgagctctc acccttcccc cactaaaaaa aaaa 1294

<210> 4
 <211> 944
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2267905CB1

<400> 4
 cccacgcgct cggttccggt caacgaagtg gttgcttttt ttagttccgg caatgagttg 60
 cggccggggcg gcggcggctc cccgcctttg gcggctgcgc ccaggggccc ggcggtcctt 120
 ctcagcttat ggaagaagaa ccagtgtcag atttcgcagt tcaggaatga cttagacaa 180
 tatcagtcgg gcagctgtgg atcgaataat ccgggtggat catgcaggcg aatatggagc 240
 aaaccgcata tatgcccggc agatggctgt cctgggtcgg accagcgtcg ggccagtcac 300
 tcagaaaatg tgggatcaag aaaaggacca tttgaaaaag tccaatgagt tgatggttat 360
 gttcagggtc cggccaacag ttctgatgcc cttgtggaac gtgctggggt ttgcaactgg 420
 ggcggggacc gccttgctcg ggaagggaag tgccatggcc tgcacctggc cggtggaaga 480
 gagcatagca catcactaca acaaccagat caggacgctg atggaggagg accctgaaaa 540
 atacagggaa cttcttcagc tgataaagaa atttcgggat gaagagcttg agcaccatga 600
 cataggcctc gaccatgatg cagaattggc tccagcctat gccgtcctga agagcattat 660

```

ccaggccgga tgcagagtgg cgatatatatt atcagaaaga ttataaagtg tgtccagttt 720
tgcctgtcta taaaagatga tagtaattta ccaagtgaca ttgacagaga aacagtgta 780
cagttatcgt tgtacttttg tacaatgtga attttgtaa taaattataa ggtttgttt 840
tttttttta aactctgcag tgttgatttt tctctggggt gtttttctg ccatgagacc 900
aacaggtcac cagccttggt caagttacag caaacgaagc tggg 944

```

<210> 5

<211> 260

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<300>

<308> GenBank ID No: g1561732

<400> 5

```

Met Arg Ser Leu Ser Arg Phe Arg Leu Ile Thr Phe Asp Val Thr
 1                    5          10          15
Asn Thr Leu Leu Gln Phe Arg Thr Thr Pro Gly Lys Gln Tyr Gly
 20                    25          30
Glu Ile Gly Ala Leu Phe Gly Ala Arg Cys Asp Asn Asn Glu Leu
 35                    40          45
Ala Lys Asn Phe Lys Ala Asn Trp Tyr Lys Met Asn Arg Asp Tyr
 50                    55          60
Pro Asn Phe Gly Arg Asp Thr Asn Pro Gln Met Glu Trp Gln Gln
 65                    70          75
Trp Trp Arg Lys Leu Ile Ala Gly Thr Phe Ala Glu Ser Gly Ala
 80                    85          90
Ala Ile Pro Asp Glu Lys Leu His Asn Phe Ser Asn His Leu Ile
 95                    100         105
Glu Leu Tyr Lys Thr Ser Ile Cys Trp Gln Pro Cys Asn Gly Ser
 110                   115         120
Val Glu Leu Leu Gln Leu Arg Lys Glu Leu Lys Pro Glu Lys
 125                   130         135
Cys Lys Leu Gly Val Ile Ala Asn Phe Asp Pro Arg Leu Pro Thr
 140                   145         150
Leu Leu Gln Asn Thr Lys Leu Asp Gln Tyr Leu Asp Phe Ala Ile
 155                   160         165
Asn Ser Tyr Glu Val Gln Ala Glu Lys Pro Asp Pro Gln Ile Phe
 170                   175         180
Gln Lys Ala Met Glu Lys Ser Gly Leu Lys Asn Leu Lys Pro Glu
 185                   190         195
Glu Cys Leu His Ile Gly Asp Gly Pro Thr Thr Asp Tyr Leu Ala
 200                   205         210
Ala Lys Glu Leu Gly Trp His Ser Ala Leu Val His Glu Lys Ser
 215                   220         225
Tyr Ala Tyr Leu Val Lys Lys Tyr Gly Glu Asp Ile Asp Arg Asp
 230                   235         240
His Val Phe Pro Ser Leu Tyr Asp Phe His Lys Lys Ile Ser Asp
 245                   250         255
Gly Ala Val Val Trp
 260

```

```

<210> 6
<211> 217
<212> PRT
<213> Mus musculus

<300>
<308> GenBank ID No: g3415017

<400> 6
Met Ser Ala Ala Gly Ala Ile Ala Ala Ala Ser Val Gly Arg Leu
 1          5          10          15
Arg Thr Gly Val Arg Arg Pro Phe Ser Glu Tyr Gly Arg Gly Leu
 20          25          30
Ile Ile Arg Cys His Ser Ser Gly Met Thr Leu Asp Asn Ile Asn
 35          40          45
Arg Ala Ala Val Asp Arg Ile Ile Arg Val Asp His Ala Gly Glu
 50          55          60
Tyr Gly Ala Asn Arg Ile Tyr Ala Gly Gln Met Ala Val Leu Gly
 65          70          75
Arg Thr Ser Val Gly Pro Val Ile Gln Lys Met Trp Asp Gln Glu
 80          85          90
Lys Asn His Leu Lys Lys Phe Asn Glu Leu Met Ile Ala Phe Arg
 95          100         105
Val Arg Pro Thr Val Leu Met Pro Leu Trp Asn Val Ala Gly Phe
 110         115         120
Ala Leu Gly Ala Gly Thr Ala Leu Leu Gly Lys Glu Gly Ala Met
 125         130         135
Ala Cys Thr Val Ala Val Glu Glu Ser Ile Ala Asn His Tyr Asn
 140         145         150
Asn Gln Ile Arg Met Leu Met Glu Glu Asp Pro Glu Lys Tyr Glu
 155         160         165
Glu Leu Leu Gln Val Ile Lys Gln Phe Arg Asp Glu Glu Leu Glu
 170         175         180
His His Asp Thr Gly Leu Asp His Asp Ala Glu Leu Ala Pro Ala
 185         190         195
Tyr Ala Leu Leu Lys Arg Ile Ile Gln Ala Gly Cys Ser Ala Ala
 200         205         210
Ile Tyr Leu Ser Glu Arg Phe
 215

```

【図面の簡単な説明】

【図1A】

CIRYP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:3) を示す。アライメントの作成にはMACDNASIS PRO software (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) を使用した。

【図1B】

CIRYP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:3) を示す。アライメントの作成にはMACDNASIS PRO softwareを使用した。

【図1C】

CIRYP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:3) を示す。アライメントの作成にはMACDNASIS PRO softwareを使用した。

【図1D】

CIRYP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:3) を示す。アライメントの作成にはMACDNASIS PRO softwareを使用した。

【図2A】

CIRYP-2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。アライメントの作成にはMACDNASIS PRO software (Hitachi Software Engineering) を使用した。

【図2B】

CIRYP-2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。アライメントの作成にはMACDNASIS PRO softwareを使用した。

【図2C】

CIRYP-2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。アライメントの作成にはMACDNASIS PRO softwareを使用した。

【図3A】

CIRYP-2 (Incyte Clone ID 2267905; SEQ ID NO:2)、CLK-1 (GI 3415017; SEQ ID NO:6)、CIRYP-1 (Incyte Clone ID 1581473; SEQ ID NO:1) 及びDreg-2 (GI 1561732; SEQ ID NO:5) の間のアミノ酸配列アライメントを示す図である。アライメントの作成にはLASERGENEソフトウェアのマルチシーケンス・アライメントプログラム (DNASTAR, Madison WI) を使用した。

【図3B】

CIRYP-2 (Incyte Clone ID 2267905; SEQ ID NO:2)、CLK-1 (GI 3415017; SEQ ID NO:6)、CIRYP-1 (Incyte Clone ID 1581473; SEQ ID NO:1) 及びDreg-2 (GI 1561732; SEQ ID NO:5) の間のアミノ酸配列アライメントを示す図である。アライメントの作成にはLASERGENEソフトウェアのマルチシーケンス・アライメントプログラム (DNASTAR, Madison WI) を使用した。

【表1】


【表2】

表1-1

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して不明瞭な塩基をマスキングする。	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder は、アミノ酸又は核酸配列の比較や注射付けに有用である。	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA.	ミスマッチ<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラムである。	Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA.; Paracel inc., Pasadena, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool は、アミノ酸及び核酸配列の配列類似性検索に有用である。BLAST には、blastp 及び blastn、blastx、tblastn、tblastx の 5 つの機能があ	Altschul, S.F.ら(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F.ら(1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8以下 完全長配列: 確率値=1.0E-10以下
FASTA	Pearson 及び Lipman アルゴリズムは、問合わせの配列と同種の配列のグループとの類似性を検索する。FASTA は、少なくとも 5 つの機能 fasta、tfasta、fastx、tfastx、及び ssearch からなる。	Pearson, W.R.及び D.J. Lipman (1988) Proc.Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; Pearson, W.R.(1990) Methods Enzymol. 183: 63-98; Smith, T.F.及び M. S. Waterman (1981) Adv.Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E 値=1.06E-6 Assembled ESTs: fasta 同一性=95%以上 一致長さ=200 塩基以上 fastx E 値=1.0E-8以下 完全長配列: fastx スコア=100以上
BLIMPS	BLOCKS IMPROVED Searcher は配列を、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM 及び PFAM データベースにおける配列と一致させて、遺伝子ファミリー及び配列相同性、構造的フィンガンブリント領域を検索する。	Itenikoff, S 及び J.G. Henikoff, Nucl. Acid Res., 19:6565-72, 1991. J.G. Henikoff 及び S.Henikoff (I 996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, T.K.ら(1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37: 417-424.	スコア=1000 以上 スコア/強度=0.75 以上 、確率値=1.0E-3 以下(適用可能な場合)
HMMER	PFAM 等のタンパク質ファミリーコンセンサス配列の Hidden Markov model (HMM) に基づいたデータベースの検索のためのアルゴリズムである。	Krogh, A.ら (1994) J. Mol. Biol., 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L.ら(1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322.	スコア=10 ⁻⁵⁰ ビット、各タンパク質ファミリーによって異なる。

表1-2

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ProfileScan	Prosite で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列における構造的及び配列モチーフを検索するアルゴリズムである。	Gribskov, M.ら(1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov ら(1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A.ら(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	標準化されたクオリテイのスコア ア≧特定の Prosite モチーフに 対する GCG に特異的な"HIGH" 値 通常、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度及び確率で自動の配列のトレースを検査する塩基呼び出しアルゴリズムである。	Ewing, B.ら(1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B.及び P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムを効率的に利用したプログラムである SWAT や CrossMatch を含む Phils Revised Assembly プログラムは、配列の相同性の検索及び DNA 配列の構築に有用である。	Smith, T.F.及び M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; 並びに Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120 以上; 一致長さ=56 以上
Consed	Phrap assemblies の編集及び観察用のグラフィックツールである。	Gordon, D.ら(1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	分泌シグナルペプチドの存在するかどうかタンパク質配列をスクリーンするウエイトマトリックス分析プログラムである。	Nielson, H.ら(1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. 及び S. Audic (1997) CABIOS 12: 431-439.	スコア=3.5 以上
Motifs	Prosite で定義された配列と一致するパターンをアミノ酸配列に対して検索するプログラムである。	Bairoch ら、 前出; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

【 1 A】

11 20 29 38 47 56
 5' CTG CGT CAG GTC CGG GCT CCT GGA CTT CGC CTT TCC CGA GCC CTG GAG GTG GGG

 65 74 83 92 101 110
 AGA AAA GGT TCA CCA ATT TTT AAA ATC CAA ATA TAT CTC ATG GTA CAG TGG AAG

 119 128 137 146 155 164
 AAC TGG CCA GAG AGT CTG GAA GTT TGG GTT CTG GTC CTG GCT GTG CCA CTG ACT

 173 182 191 200 209 218
 CAC TGT GAC CTT GGG ATC TTG TGC TGT GAA GAC ATT TCC CAA GTG CTT CAT GTT

 227 236 245 254 263 272
 AGC CAG CAA ATC TGA CCC ACA AGG CCT GCA AAG AGG TGA TTG TTA GGT TGC GCA

 281 290 299 308 317 326
 GAG GTG GTC TTA TCC AGC TCA GCT TCC CCT GGG ACC CAC CGT GGG ACC TGA GGC

 335 344 353 362 371 380
 AGA ACT GGG GTG GAC TTG GCC TCC ATG GCA CAC CGG CTG CAG ATA CGA CTG
 M A H R L Q I R L

FIGURE 1A

【図1B】

CTG	ACG	TGG	GAT	GTG	AAG	GAC	ACG	CTG	CTC	AGG	CTC	CGC	CAC	CCC	TTA	GGG	GAG	434
L	T	W	D	V	K	D	T	L	L	R	L	R	H	P	L	G	E	
		389			398			407		416				425				
GCC	TAT	GCC	ACC	AAG	GCC	CGG	GCC	CAT	GGG	CTG	GAG	GTG	GAG	CCC	TCA	GCC	CTG	488
A	Y	A	T	K	A	R	A	H	G	L	E	V	E	P	S	A	L	
		443			452			461		470				479				
GAA	CAA	GGC	TTC	AGG	CAG	GCA	TAC	AGG	GCT	CAG	AGC	CAC	AGC	TTC	CCC	AAc	TAC	542
E	Q	G	F	R	Q	A	Y	R	A	Q	S	H	S	F	P	N	Y	
		497			506			515		524				533				
GGC	CTG	AGC	CAC	GGC	CTA	ACC	TCC	CGC	CAG	TGG	TGG	CTG	GAT	GTG	GTC	CTG	CAG	596
G	L	S	H	G	L	T	S	R	Q	W	W	L	D	V	V	L	Q	
		551			560			569		578				587				
ACC	TTC	CAC	CTG	GGT	GTC	CAG	GAT	GCT	CAG	GCT	GTA	GCC	CCC	ATC	GCT	GAA	E	650
T	F	H	L	A	G	V	Q	D	A	Q	A	V	A	P	I	A	E	
		605			614			623		632				641				
CAG	CTT	TAT	AAA	GAC	TTC	AGC	CAC	CCC	TGC	ACC	TGG	CAG	GTG	TTG	GAT	GGG	GCT	704
Q	L	Y	K	D	F	S	H	P	C	T	W	Q	V	L	D	G	A	
		659			668			677		686				695				
GAG	GAC	ACC	CTG	AGG	GAG	TGC	CGC	ACA	CGG	GGT	CTG	AGA	CTG	GCA	GTG	ATC	TCC	758
E	D	T	L	R	E	C	R	T	R	G	L	R	L	A	V	I	S	
		713			722			731		740				749				

FIGURE 1B

767	776	785	794	803	812
AAC TTT GAC CGA CGG CTA GAG GGC ATC CTG GGG GGC CTT GGC CTG GAA CAC					
N F D R R L E G I L G G L G L R E H					
821	830	839	848	857	866
TTC GAC TTT GTG CTG ACC TCC GAG GCT GCT GGC TGG CCC AAG CCG GAC CCC CGC					
F D F V L T S E A A G W P K P D P R					
875	884	893	902	911	920
ATT TTC CAG GAG GCC TTG CCG CTT GCT CAT ATG GAA CCA GTA GTG GCA GCC CAT					
I F Q E A L R L A H M E P V A A H					
929	938	947	956	965	974
GTT GGG GAT AAT TAC CTC TGC GAT TAC CAG GGG CCT CGG GCT GTG GGC ATG CAC					
V G D N Y L C D Y Q G P R A V G M H					
983	992	1001	1010	1019	1028
AGC TTC CTG GTG GTT GGC CCA CAG GCA CTG GAC CCC GTG GTC AGG GAT TCT GTA					
S F L V V G P Q A L D P V V R D S V					
1037	1046	1055	1064	1073	1082
CCT AAA GAA CAC ATC CTC CCC TCT CTG GCC CAT CTC CTG CCT GCC CTT GAC TGC					
P K E H I L P S L A H L L P A L D C					
1091	1100	1109	1118	1127	1136
CTA GAG GGC TCA ACT CCA GGG CTT TGA GGC CAG TGA GGG AAG TGG CTG GGC CCT					
L E G S T P G L					

FIGURE 1C

【 1 D 】

1145 1154 1163 1172 1181 1190
AGG CCA TGG AGA AAA CCT TAA ACA AAC CCT GGA GAC AGG GAG CCC CTT CTT TCT

1199 1208 1217 1226 1235 1244
CCA CAG CTC TGG ACC TTT CCC CCT CTC CCT GCG GCC TTT GTC ACC TAC TGT GAT

1253 1262 1271 1280 1289
AAT AAA GCA GTG AGT GCT GAG CTC TCA CCC TTC CCC CAC TAA AAA AAA AA 3'

(92)

特表2002-534116

FIGURE 1D

【圖 2 A】

5'	CCA	CGC	GTC	CGG	TTC	CGT	TCA	ACG	AAG	TGG	TTG	CTT	TTT	TTA	GTT	CCG	GCA	ATG	55
																			M
	64	AGT	TGC	GCC	GGG	GCG	GCG	GCT	CCC	CGC	CIT	TGG	CGG	CTG	CGC	CCA	GGG	GCC	109
		S	C	A	G	A	A	A	P	R	L	W	R	L	R	P	G	A	
	118	CGG	CGG	TCC	CTC	TCA	GCT	TAT	GGA	AGA	AGA	ACC	ACT	GTC	AGA	TTT	CGC	AGT	163
		R	R	S	L	S	A	Y	G	R	R	T	S	V	R	F	R	S	S
	172	GGA	ATG	ACT	TTA	GAC	AAT	ATC	AGT	CGG	GCA	GCT	GTC	GAT	CGA	ATA	ATC	CGG	217
		G	M	T	L	D	N	I	S	R	A	A	V	D	R	I	I	R	V
	226	GAT	CAT	GCA	GGC	GAA	TAT	GGA	GCA	AAC	CGC	ATC	TAT	GCC	GGG	CAG	ATG	GCT	271
		D	H	A	G	E	Y	G	A	N	R	I	Y	A	C	Q	M	A	V
	280	CTG	GGT	CGG	ACC	AGC	GTC	GGG	CCA	GTC	ATT	CAG	AAA	ATG	TGG	GAT	CAA	GAA	325
		L	G	R	T	S	V	G	P	V	I	Q	K	M	W	D	Q	E	K
	334	GAC	CAT	TTG	AAA	AAG	TTC	AAT	GAG	TTG	ATG	GTT	ATG	TTC	AGG	GTC	CGG	CCA	379
		D	H	L	K	K	F	N	E	L	M	V	M	F	R	V	R	P	T

FIGURE 2A

【 2 B 】

388 GTT CTG ATG CCC TTG TGG AAC GTG CTG GGG TTT GCA CTG GGG GCG GGG ACC GCC 433
 V L M P L M N V L G G F A L G A G T A
 442 GGG AAG GAA GGT GCC ATG GCC TGC ACC GTG GCG GTG GAA GAG AGC ATA 487
 L L G K E G A M A C T V A V E E S I
 496 CAT TAC AAC AAC CAG ATC AGG ACG CTG ATG GAG GAG GAC CCT GAA AAA 541
 A H Y N N Q I R T L M E E D P E K
 550 GAA CTT CTT CAG CTG ATA AAG AAA TTT CGG GAT GAA GAG CTT GAG CAC 595
 Y E L L L Q L I K K F R D E E L E H
 604 GAC ATA GGC CTC GAC CAT GAT GCA GAA TTG GCT CCA GCC TAT GCC GTC CTG 649
 H D I G L D H D A E L A P A Y A V L
 658 ATT ATC CAG GCC GGA TCC AGA GTG GCG ATA TAT TTA TCA GAA AGA TTA 703
 K S I I Q A G C R V A I Y L S E R L
 712 AGT GTG TCC AGT TTT GCC TGT CTA TAA AAG ATG ATA GTA ATT TAC CAA GTG 757
 397 406 415 424 460 469 514 523 532 577 586 622 631 676 685 730 739 748

FIGURE 2B

【 2 C 】

766 775 784 793 802 811
ACA TTT GCA GAG AAA CAG GTG TAC AGT TAT CGT TGT ACT TTT GTA CAA TGT GAA

820 829 838 847 856 865
TTT TGT TAA TAA ATT ATA AGG TTT GTT TTT TTT TTA AAC TCT GCA GTG TTG

874 883 892 901 910 919
ATT TTT CTC TGG GTT GTT TTT TCT GCC ATG AGA CCA ACA ACA GGT CAC CAG CCT TGT

928 937
TCA AGT TAC AGC AAA CGA AGC TGG G 3'

(95)

特表 2002 - 534116

FIGURE 2C


```

110 V L M P - - - L W N V L G F A L G A G T A L L G K E G A M A 2267905
110 V L M P - - - L W N V A G F A L G A G T A L L G K E G A M A 93415017
143 G I L G G L G L R E H F D F V L T S E A A G W P K P D P R I 1581473
150 T L L Q N T K L D Q Y L D F A I N S Y E V Q A E K P D P Q I 91561732

137 C T V A V E E S I A H H Y N N Q I R T L M E E D P E - K Y - 2267905
137 C T V A V E E S I A N H Y N N Q I R M L M E E D P E - K Y - 93415017
173 F Q E A L R - - - L A H M E P V V A A H V G D N Y L C D Y Q 1581473
180 F Q K A M E K S G L K N L K P E E C L H I G D C P T T D Y L 91561732

165 - - - - - E E L L Q L I K K F R D E E L E H H D I G L D 2267905
165 - - - - - E E L L Q V I K Q F R D E E L E H H D T G L D 93415017
200 G P R A V G M H S F L V V G P Q A L D P V V R - - - D S V P 1581473
210 A K E L G W H S A L V H E - K S Y A Y L V K K Y G E D I D 91561732

188 H D A E L A P A Y A V L K S I I Q A G C R V A I Y L S E R L 2267905
188 H D A E L A P A Y A L L K R I I Q A G C S A A I Y L S E R F 93415017
227 K E H I L P S L A H L L P A L - - - D C L E G S - - T P G L 1581473
239 R D H V F P S L Y D F H K - - - - - I S D G - - A V V W 91561732

```

FIGURE 3B

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/01086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N5/10 A01K57/027	C07K14/47 G01N33/48
	C12N15/10	C12N15/63
		C07K16/18
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 A01K 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.
A	LIEBMANN P.M. ET AL.: "Circadian rhythm of the soluble p75 tumor necrosis factor (sTNF-R75) receptor in humans—a possible explanation for the circadian kinetics of TNF-alpha effects" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 10, no. 9, September 1998 (1998-09), pages 1393-1396, XP000864584 the whole document	1-17,20, 23
P,X	WO 99 40189 A (GENSET) 12 August 1999 (1999-08-12) SEQ ID NO:1 and 2 claims 1,9,13-17	1,3,8-15
	-/-	
<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 relating 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
7 June 2000		06.09.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schönwasser, D

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/US 00/01086

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 99 47540 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 23 September 1999 (1999-09-23) page 135 -page 136; claims 1,7-17 page 343	1,3,8-16
A	--- NCI-CGAP: "National Cancer Institute, Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), Tumor Gene Index http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap; ow91d05.x1 Soares_fetal_liver_spleen_1NFLS_S1_Homo sapiens_cDNA_clone IMAGE:1654185 3'similar to TR:Q94915 Q94915 DREG-2 PROTEIN.; mRNA sequence." EMBL DATABASE ENTRY AI022747; ACCESSION NO. AI022747,19 June 1998 (1998-06-19), XP002138116	1,3
A	--- VAN GELDER R.N. ET AL.: "Extent and character of circadian gene expression in <i>Drosophila melanogaster</i> : identification of twenty oscillating mRNAs in the fly head" CURRENT BIOLOGY, vol. 5, no. 12, 1 December 1995 (1995-12-01), pages 1424-1436, XP000864597 cited in the application the whole document	1-17,20, 23
A	--- C A SMITH ET AL: "A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 248, no. 248, 25 May 1990 (1990-05-25), pages 1019-1022, XP002107350 ISSN: 0036-8075	1-17,20, 23
A	--- NOPHAR Y ET AL: "SOLUBLE FORMS OF TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTORS (TNF-RS). THE CDNA FOR THE TYPE 1 TNF-R, CLONED USING AMINO ACID SEQUENCE DATA OF ITS SOLUBLE FORM, ENCODES BOTH THE CELL SURFACE AND A SOLUBLE FORM OF THE RECEPTOR" EMBO JOURNAL, vol. 9, no. 10, 1 October 1990 (1990-10-01), pages 3269-3278, XP002025930 ISSN: 0261-4189 -----	1-17,20, 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l application No.
 PCT/US 00/01086
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:
 Although claim 16 is 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.
2. Claims Nos.: 18,19,21,22
 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.:
 1-17,20,23 partially

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-17,20,23 (partially)

An isolated polypeptide comprising: a) an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, b) a naturally occurring amino acid sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO:1, c) a biologically active fragment of SEQ ID NO:1, or d) an immunogenic fragment of SEQ ID NO:1; an isolated polynucleotide encoding said polypeptide; a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to said polynucleotide; a cell transformed with said recombinant polynucleotide; a transgenic organism comprising said polynucleotide; a method for producing above mentioned polypeptide; an isolated antibody which specifically binds to said polypeptide; an isolated polynucleotide comprising: a) a polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3, b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO:3, c) a polynucleotide sequence complementary to a), or d) a polynucleotide sequence complementary to b); an isolated polynucleotide comprising at least 60 contiguous nucleotides of said polynucleotide; a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of above mentioned polynucleotide; a pharmaceutical composition comprising an effective amount of above mentioned polypeptide; a method of treating a disease or condition comprising the administration of said pharmaceutical composition to a patient; methods for screening of a compound comprising inter alia exposing a sample comprising said polypeptide to a compound; a method for screening of a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide comprising inter alia exposing a sample comprising said target polynucleotide to a compound.

2. Claims: 1-17,20,23 (partially)

Invention II relates to subject-matter as defined above for "invention I", with the exception, that invention II refers to the polypeptide sequence SEQ ID NO:2 and the respective nucleotide sequence SEQ ID NO:4.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18,19,21,22

Claims 18 and 21 refer to a pharmaceutical composition comprising inter alia an agonist compound or an antagonist compound, respectively, whereby said agonist and antagonist compounds were identified in a certain screening method. Further claims 19 and 22 refer to methods of treating a disease or condition comprising the administration of said pharmaceutical compositions to a patient.

No true technical characterization of such agonist and antagonist compounds is given and no such agonist and antagonist compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported. No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is a mere recitation of the result to be achieved.

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

(information on patent family members)

International Application No.

PCT/US 00/01086

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9940189 A	12-08-1999	AU 1049199 A	07-06-1999
		AU 1503099 A	05-07-1999
		AU 2294499 A	23-08-1999
		EP 1029045 A	23-08-2000
		WO 9925825 A	27-05-1999
		WO 9931236 A	24-06-1999
WO 9947540 A	23-09-1999	AU 3451799 A	11-10-1999
		AU 3072799 A	11-10-1999
		WO 9947538 A	23-09-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 P		A 6 1 P	4 C 0 8 4
1/16		5/14	4 C 0 8 5
1/18		13/02	4 H 0 4 5
5/14		13/08	
13/02		15/00	
13/08		15/08	
15/00		19/00	
15/08		21/00	
19/00		25/00	1 0 1
21/00		25/08	
25/00	1 0 1	25/14	
25/08		25/16	
25/14		25/18	
25/16		25/20	
25/18		25/28	
25/20		27/06	
25/28		27/12	
27/06		27/16	
27/12		31/18	
27/16		35/00	
31/18		37/02	
35/00		C 0 7 K	
37/02		14/47	
C 0 7 K		16/18	
14/47		C 1 2 N	
16/18		1/15	
C 1 2 N		1/19	
1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P	C
1/21		21/02	A
5/10		C 1 2 Q	Z
C 1 2 P		1/68	Z
21/02		G 0 1 N	M
C 1 2 Q		33/15	
1/68		33/50	
G 0 1 N		33/53	
33/15		33/566	
33/50		C 1 2 N	Z N A A
33/53		15/00	A
33/566		5/00	
		A 6 1 K	
		37/02	

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

(72)発明者 タング、ワイ・トム

アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・
サンノゼ・ランウィックコート 4230

(72)発明者 リュ、デュング・アイナ・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州95136・
サンノゼ・パークベルモントプレイス 55

(72)発明者 アジムザイ、ヤルダ

アメリカ合衆国カリフォルニア州94545・
ハイワード・ロックスプリングスドライブ
2045

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA35 BB20 CA26 CB03
DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03 FB06 FB07
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02
EA04 FA02 GA11 HA12
4B063 QA19 QA20 QQ43 QR08 QR33
QR42 QR56 QS25 QS34 QX02
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01
DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02
CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA08
BA22 BA23 BA44 CA17 CA53
CA56 CA59 CA62 DC50 NA14
ZA022 ZA052 ZA062 ZA162
ZA182 ZA202 ZA332 ZA342
ZA662 ZA682 ZA712 ZA752
ZA812 ZA942 ZA962 ZB072
ZB262 ZC062 ZC352 ZC552
4C085 AA03 CC01 CC21 DD23 EE01
GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA75 EA20 EA50 FA72
FA74

专利名称(译)	昼夜节律相关蛋白质		
公开(公告)号	JP2002534116A	公开(公告)日	2002-10-15
申请号	JP2000593729	申请日	2000-01-14
申请(专利权)人(译)	洞察制药公司		
[标]发明人	ヒルマンジェニファーエル タングワイトム リュデュングアイナエム アジムザイヤルダ		
发明人	ヒルマン、ジェニファー・エル タング、ワイトム リュ、デュング・アイナ・エム アジムザイ、ヤルダ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P5/14 A61P13/02 A61P13/08 A61P15/00 A61P15/08 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P13/02 A61P13/08 A61P15/00 A61P15/08 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 C07K14/47		
FI分类号	A61K39/00.H A61K45/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P5/14 A61P13/02 A61P13/08 A61P15/00 A61P15/08 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00.101 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/28 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA17 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/CA62 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA052 4C084/ZA062 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA712 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA03 4C085/CC01 4C085/CC21 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/183019 1999-01-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了昼夜节律相关蛋白 (CIRYP) 和鉴定和编码CIRYP的多核苷酸。 本发明还提供表达载体，宿主细胞，抗体，激动剂和拮抗剂。 此外，本发明提供了用于诊断，治疗或预防与CIRYP表达有关的疾病的方法。

