

(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 - 538827

(P2002 - 538827A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(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 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/46		A 6 1 P 1/16	4 B 0 2 4
45/00		1/18	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/16		3/10	4 B 0 6 4
1/18		7/04	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全220数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000 - 605750(P2000 - 605750)	(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 I N C Y T E P H A R M A C E U T I C A L S I N C . 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
(86)(22)出願日	平成12年3月17日(2000.3.17)	(72)発明者	バンドマン、オルガ アメリカ合衆国カリフォルニア州94043・マ ウンテンビュー・アンナアベニュー 366
(85)翻訳文提出日	平成13年9月11日(2001.9.11)	(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
(86)国際出願番号	PCT/US00/07277	(74)代理人	弁理士 大島 陽一
(87)国際公開番号	W000/55332		最終頁に続く
(87)国際公開日	平成12年9月21日(2000.9.21)		
(31)優先権主張番号	60/125,593		
(32)優先日	平成11年3月18日(1999.3.18)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	60/135,049		
(32)優先日	平成11年5月20日(1999.5.20)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 細胞内リン酸化反応のレギュレータ

(57)【要約】

本発明は、ヒトの細胞内リン酸化反応のレギュレータ (HRIP) と、HRIPを同定しコードするポリヌクレオチドとを提供する。本発明はまた、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、HRIPの発現に関連する疾患の診断または治療方法、予防方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の（a）乃至（d）からなる群から選択したアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチド。

（a）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列

（b）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列

（c）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片

（d）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片

【請求項2】 配列番号1乃至14からなる群から選択した請求項1に記載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】 配列番号15乃至28からなる群から選択した請求項3に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 請求項3に記載のポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモータ配列からなる組換えポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項5に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項7】 請求項5に記載の組換えポリヌクレオチドからなる遺伝形質転換体。

【請求項8】 請求項1に記載のポリペプチドを製造する方法であって、

（a）組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を前記ポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、

（b）そのように発現した前記ポリペプチドを受容する過程とからなり、

前記組換えポリヌクレオチドが、請求項1に記載の前記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からなることを特徴とする方法。

【請求項9】 請求項1に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項10】 以下の(a)乃至(d)からなる群から選択したポリヌクレオチド配列からなる単離されたポリヌクレオチド。

(a) 配列番号15乃至28からなる群から選択したポリヌクレオチド配列

(b) 配列番号15乃至28からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列

(c) (a)に相補的なポリヌクレオチド配列

(d) (b)に相補的なポリヌクレオチド配列

【請求項11】 請求項10に記載の或るポリヌクレオチドの少なくとも60の連続した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に記載のポリヌクレオチドの或る配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列からなる少なくとも16の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、

前記プローブと前記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ような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。

【請求項13】 前記プローブが少なくとも30の連続したヌクレオチドからなることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記プローブが少なくとも60の連続したヌクレオチドからなることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項15】 有効量の請求項1のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とからなることを特徴とする医薬品成分。

【請求項16】 機能性HRIPの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項15に記載の

医薬品成分を投与する過程からなることを特徴とする方法。

【請求項17】 請求項1に記載のポリペプチドのアゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とからなることを特徴とする方法。

【請求項18】 請求項17に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とからなることを特徴とする医薬品成分。

【請求項19】 機能性HRIPの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項18に記載の医薬品成分を投与する過程からなることを特徴とする方法。

【請求項20】 請求項1に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とからなることを特徴とする方法。

【請求項21】 請求項20に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とからなることを特徴とする医薬品成分。

【請求項22】 機能性HRIPの過剰発現に関連する疾患又は病状の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項21に記載の医薬品成分を投与する過程からなることを特徴とする方法。

【請求項23】 請求項4に記載の配列からなる標的ポリペプチドの発現を変異させる際に有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリペプチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記標的ポリペプチドの変異した発現を検出する過程とからなることを

特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、細胞内リン酸化反応のレギュレータの核酸配列およびアミノ酸配列に関し、神経疾患、細胞増殖異常及び自己免疫/炎症疾患の診断、治療並びに予防におけるこれらの配列の利用に関する。

【0002】**(発明の背景)**

タンパク質の可逆リン酸化反応は、真核細胞の活性を制御するための主要なストラテジーである。キナーゼ及びホスファターゼは可逆リン酸化反応を調節する。それゆえにキナーゼ及びホスファターゼは細胞内シグナル形質導入経路の重要な構成要素である。プロテインキナーゼは、細胞外シグナル(ホルモン、神経伝達物質、成長因子、分化因子等)、細胞周期チェックポイント(例えば有糸分裂イベントに関連するシグナル)及び環境または栄養ストレスに応じて、アデノシン3リン酸(ATP)から特定タンパク質ターゲットへ高エネルギーリン酸を移転させる。プロテインホスファターゼは、タンパク質からリン酸基を除去することによってキナーゼ効果を仲介する。

【0003】

通常哺乳動物細胞内で活性である10,000のタンパク質のうち1,000以上のタンパク質がリン酸化すると推定されている。一般に、タンパク質活性はリン酸化によって誘導されるものであり、これは分子のスイッチをオンにするのと類似している。スイッチをオンにすると、適正なプロテインキナーゼが代謝性酵素、調節タンパク質、受容体、細胞骨格タンパク質、イオンチャネルまたはポンプ、或いは転写因子を活性化する。シグナル経路の下方制御が必要な場合には、脱リン酸化によってタンパク質活性が抑制される。キナーゼ及びホスファターゼの座標活性は、細胞増殖、細胞分化、細胞と細胞のコミュニケーション及び細胞周期等の基本過程を調整する。抑制されていないシグナル伝達は、炎症、癌、動脈硬化症、乾癬を含む様々な病状に関係してきた。

【0004】

プロテインキナーゼは、ヒドロキシル化したアミノ酸上でタンパク質受容体分子をリン酸化する。これらのキナーゼは、かなりよく知られているタンパク質群即ち著しく多彩な機能及び特異性を有するような酵素のスーパーファミリーから構成されている。プロテインキナーゼは通常、基質、調節分子または突然変異表現型のアスペクトに因んで命名される。基質に関しては、プロテインキナーゼは、チロシン残基（プロテインチロシンキナーゼ (PTK)）をリン酸化するものと、セリンまたはトレオニン残基（セリン/トレオニンキナーゼ (STK)）をリン酸化するものとの2つに大別することができる。二重特異性及びホスホリラーゼセリン、トレオニン及びチロシン残基を有するプロテインキナーゼは殆どない。STK及びPTKには、両ファミリーの構造特性を有するものがある (Hardie, G. and S. Hanks (1995) The Protein Kinase Facts Book, Vol. 1:7-20, Academic Press, San Diego CA)。

【0005】

保存された250～300アミノ酸キナーゼドメインは殆ど全てのキナーゼに含まれており、このドメインは2葉構造に折り重なっている。キナーゼドメインの1次構造は保存されており、更に11サブドメインに細分することが可能である。キナーゼドメインの小さな方のN末端葉は、サブドメインIからIVを有し、主としてATP（またはGTP）ドナー分子の結合及び配向に関与している。大きな方のC末端葉は、サブドメインVIからXIを有し、タンパク質基質を結合し、 γ リン酸をATPからセリン、トレオニンまたはチロシン残基のヒドロキシル基へと移転させる。サブドメインVは、2葉の橋渡しをする。11サブドメインには各々、固有のサブドメインに特有の固有のアミノ酸残基及びモチーフが含まれており、高度に保存されている。(Hardie, G. and S. Hanks (1995) The Protein Kinase Facts Book, Vol. 1:7-20, Academic Press, San Diego CA)。特に2つのプロテインキナーゼサイン配列は、キナーゼドメイン内で同定されていた。第1の配列にはATP結合に関与する活性部位リシン残基（サブドメインII）が、第2の配列には触媒活性に重要なアスパラギン酸残基（サブドメインVI）が含まれている。キナーゼは、キナーゼドメインの側面に位置する或いはキナーゼドメインに挿入されたような種々のアミノ酸配列（通常5～100残基）によってファミリ

ーに分類することもできる。キナーゼは、標的タンパク質を認識し、相互作用を及ぼすので、これら追加のアミノ酸配列は各キナーゼの調節に關与する。

【0006】

PTKは、膜内外または非膜内外のいずれかに分類し得る。膜内外PTKは、殆どの成長因子に対して受容体として機能する。成長因子は受容体チロシンキナーゼ(RTK)に結合し、RTKにRTK自体をリン酸化(自動リン酸化)させ且つ特定細胞内第2メッセンジャータンパク質もリン酸化させる。RTKを結合する成長因子には、表皮成長因子、血小板派生成長因子、線維芽細胞成長因子、肝細胞成長因子、インスリン及びインスリン様成長因子、神経成長因子、血管内皮成長因子及びマクロファージコロニー刺激因子がある。

【0007】

非膜内外PTKは、原形質膜受容体のサイトソルドメインを用いてシグナル伝達複合体を形成する。非膜内外PTKを介してシグナルを送る受容体には、サイトカイン及びホルモンのための受容体(成長ホルモン、プロラクチン等)及びT及びBリンパ球上の抗原特異受容体がある。多数の非膜内外PTKは、癌細胞内で突然変異型腫瘍遺伝子産物として先ず認識された。癌細胞内では、正常細胞の制御はもはやPTK活性化の条件ではなかった。公知の腫瘍遺伝子の約3分の1がPTKをコードする。細胞形質転換(腫瘍形成)がしばしばチロシンリン酸化活性の増加によって達成されることはよく知られている(Charbonneau Hand N.K. Tonks (1992) Anno. Rev. Cell Biol. 8:463-493)。従って、或る種の癌を制御する際にPTK活性の調節は重要なストラテジーとなり得る。

【0008】

STKは、非膜内外タンパク質である。STKは第2メッセンジャー依存プロテインキナーゼを有している。第2メッセンジャー依存プロテインキナーゼは、cAMP、cGMP、イノシトールトリリン酸、ホスファチジルイノシトール3,4,5-トリリン酸、cADPリボース、アラキドン酸、ジアシルグリセロール、カルシウム-カルモジュリン(CaM)等の第2メッセンジャーの効果を主として仲介する。STKには、ホルモン誘導細胞反応の仲介に關与するcAMP依存プロテインキナーゼ(PKA)と、平滑筋構造の調節、グリコーゲン破壊及び神経伝達に關与するCaM依存プロテ

ンキナーゼと、リン酸化カスケードを介して細胞表面から核へのシグナル形質導入を仲介するマイトジェン活性化タンパク質 (MAP) キナーゼと、グリコーゲン破壊及び種々の転写因子の活性化を仲介するジアシルグリセロール活性化プロテインキナーゼC (PKC) がある。PKC μ は、他のPKCと同様にPKCファミリーの新規メンバーであり、亜鉛フィンガー様の、エステル結合に必要なN末端領域に多システインモチーフを有し、ホルボールエステル独立キナーゼ活性の能力もある (Johannes, F.J. ら (1994) J. Biol. Chem. 269:6140-6148)。

【0009】

PKAは、ホルモン刺激作用に応じて細胞内で作製したcAMPによって活性化される。変異PKA発現は、癌、甲状腺障害、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患を含む種々の疾病及び疾患に関係している (Isselbacher, K.J. ら (1994) Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, New York NY, pp. 416-431, 1987)。CaM依存プロテインキナーゼは、細胞内の遊離カルシウム濃度に応じて、細胞内カルシウム受容体であるカルモジュリンによって活性化される。CaMキナーゼI及びCaMキナーゼIIは神経伝達の調節において重要な役割を果たしている。キナーゼは、アルツハイマー病等の神経疾患と、老化の認知効果に関連していた (Lynch, M.A. (1998) Prog. Neurobiol. 56:571-589 and Bonkale, W.L. ら (1999) Brain Res. 818:383-396等を参照)。CaMKは、カルモジュリン依存プロテインキナーゼドメインを含む神経細胞表面タンパク質 (ニューレキシン) であり、脳シナプス原形質膜に比較的高濃度で存在している (ハラ, Y. ら (1996) J. Neurosci. 16:2488-2494)。CaMKは、アルツハイマー病に関係するアミロイド前駆体タンパク質 (APP) を結合することが可能な複合体の一部を形成し、APP処理において重要な役割を果たし得る (Borg, J.P. ら (1998) J. Biol. Chem. 273:31633-31636)。

【0010】

サイクリン依存プロテインキナーゼ (CDK) は、細胞周期を通じて細胞の進行を制御するSTKである。サイクリンは、CDKに結合し、CDKを活性化する小調節タンパク質である。次にサイクリンは有糸分裂過程に関与する選択されたタンパク質をリン酸化し、活性化する。CDKは、活性化されるために多数の入力を必要と

する点で独特である。サイクリンに加えて、CDK活性化には特定のトレオニン残基のリン酸化及び特定のチロシン残基の脱リン酸化が必要である。細胞周期に関連するSTKの別のファミリーは、NIMA (never in mitosis) 関連キナーゼ (Nek) である。CDK及びNekは共に、動物細胞における微小管組織の中心即ち中心体の複製、成熟及び分離に関与している (Fry, A.M. ら (1998) EMBO J. 17:470-481)。

【0011】

MAPキナーゼは、細胞内シグナル伝達経路を調整する別のSTKファミリーからなる。MAPキナーゼは、リン酸化カスケードを介して細胞表面から核へのシグナル形質導入を仲介する。MAPキナーゼ経路を活性化する細胞外刺激には、表皮成長因子、紫外線、高浸透圧性媒体、熱ショック、内毒素性リポ多糖体、及び腫瘍ネクロシス因子及びインターロイキン-1等のプロ炎症性サイトカインがある。変異したMAPキナーゼの発現は、癌、炎症、免疫異常症、成長及び発達に影響する障害を含む種々の病状に関係している。

【0012】

アポトーシスは、細胞死へと導くような高度に調整されたシグナル伝達経路である。細胞死は、組織発達及びホメオスタシスにおいて重大な役割を果たす。本過程の統制解除は、自己免疫疾患、神経変性疾患及び癌を含む多数の疾患の病因に関連している。種々のSTKは、本過程において鍵となる役割を果たす。ZIPキナーゼは、N末端プロテインキナーゼドメインに加えてC末端ロイシンジッパードメインを含むSTKである。このC末端ドメインは活性化転写因子ATF4等の転写因子との相互作用と同様にキナーゼのホモ二量体化および活性化を仲介する外観を呈し、活性化転写因子ATF4は、転写因子のタンパク質 (ATF/CREB) ファミリーを結合するようなcAMP応答要素のメンバーである (サンジョウ, H. ら (1998) J. Biol. Chem, 273:29066-29071)。DRAK1及びDRAK2は、死に関連するプロテインキナーゼ (DAPキナーゼ) と相同性を共有するSTKであり、インターフェロン- γ 誘導アポトーシスにおいてそのように機能することが知られている (前出のサンジョウらの文献)。ZIPキナーゼと同様に、DAPキナーゼにはN末端キナーゼドメインに加えてC末端タンパク質-タンパク質相互作用ドメインがアンキリン

反復の形で含まれている。このタイプのキナーゼ、ZIP、DAP及びDRAKは、NIH3T3細胞に形質移入された場合にアポトーシスに関連する形態学的変化を誘導する（前出のサンジョウらの文献）。しかしながら、これらのタンパク質のN末端キナーゼ触媒ドメインまたはC末端ドメインのいずれかが欠失しているとアポトーシス活性が完全に無くなり、アポトーシスには、恐らくはレギュレータまたは特定の基質との相互作用ドメインとしてC末端ドメインにおける活性もキナーゼ活性に加えて必要である。

【0013】

RICKは、死受容体CD95に關与する特定のアポトーシス経路を仲介するものとして最近同定されたもう1つのSTKである（イノハラ，N. ら（1998）J. Biol. Chem. 273:12296-12300）。CD95は、腫瘍ネクロシス因子受容体スーパーファミリーのメンバーであり、免疫系の調節及びホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている（ナガタ，S.（1997）Cell 88:355-365）。CD95受容体シグナル伝達経路は、リガンド結合に続く受容体複合体への種々の細胞内分子の漸増に關与している。これにはシステインプロテアーゼカスパーゼ-8が含まれ、カスパーゼ-8は細胞死へ導くカスパーゼカスケードを活性化する。RICKは、N末端キナーゼ触媒ドメイン及びC末端「カスパーゼ漸増」ドメインからなる。C末端「カスパーゼ漸増」ドメインはカスパーゼ様ドメインと相互作用し、RICKがカスパーゼ-8の漸増において役割を果たしていることを示している。この解釈は、ヒト293T細胞におけるRICKの発現が、CD95アポトーシス経路に關与する種々のタンパク質によってカスパーゼ-8の活性化を促進してアポトーシスの誘導を強化するという事実裏付けられている（前出のイノハラらの文献）。

【0014】

プロテインホスファターゼは、キナーゼにより活性化した分子からリン酸基を除去することによってプロテインキナーゼの効果を調整する。ホスファターゼは、ホスファターゼの好適なホスホアミノ酸基質に基づいてチロシン特異またはセリン/トレオニン特異のいずれかとして特徴付けられる。尤も、セリン/トレオニン基及びチロシン基の両方に対して二重特異性を有するプロテインホスファターゼもある。セリン/トレオニンホスファターゼは、ホスホセリン及びホスホト

レオニン残基を脱リン酸化し、また多数のcAMP仲介ホルモン反応の重要なレギュレータでもある (Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58:453-508)。セリン/トレオニンホスファターゼは、通常2以上のサブユニットからなり、広範囲で重畳するタンパク質基質特異性を有する。

【0015】

チロシンホスファターゼは通常、主として原形質膜全域におけるシグナルの形質導入において機能する単遺伝子性タンパク質であり、膜内外受容体様タンパク質または可溶性非膜内外タンパク質のいずれかに分類される。チロシンホスファターゼは、PTKの効果を逆にするもので、リン酸化タンパク質のチロシン残基からリン酸基を除去し、細胞周期及び細胞シグナル伝達過程、リンパ球活性化及び細胞接着において重大な役割を果たす (Charbonneau, H. and N.K. Tonks (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:463-493)。細胞分裂の過程で、例えば、M期誘導ホスファターゼと呼ばれる特定のチロシンホスファターゼが、細胞分裂特異PTKであるCDC2の脱リン酸化及び活性化により、有糸分裂の誘導の際に鍵となる役割を果たしている (Krishna, S.ら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5139-5143)。

【0016】

チロシンホスファターゼは、活性部位を含む約250アミノ酸の保存触媒ドメインを共有する。活性部位コンセンサス配列は、ホスファターゼ活性に必須のシステイン残基を含む13アミノ酸を有する。更に、リンパ腫、小細胞肺癌、腺癌及び神経芽細胞腫を含む種々の腫瘍条件で転座または転位された染色体領域に、少なくとも8のチロシンホスファターゼをコードするような遺伝子がマッピングされていた。 (Charbonneau, H. and N.K. Tonks (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:463-493)。既述の通り、多数のPTKが腫瘍遺伝子にコードされ、腫瘍はしばしばチロシンリン酸化活性の増加によって形成される。従って、細胞におけるチロシンリン酸化レベルを制御することによって、チロシンホスファターゼは細胞形質転換及び種々の癌の成長を予防または逆行させることが可能である。この仮説は、チロシンホスファターゼの過剰発現が細胞内で形質転換を抑制すること及びチロシンホスファターゼの固有の阻害剤が細胞形質転換を増進することを示す

研究によって裏付けられている（前出のCharbonneau and Tonksの文献）。

【0017】

タンパク質リン酸化に加えて、脂質リン酸化も或る種のシグナル伝達経路において役割を果たす。ホスファチジルイノシトールのリン酸化は、PKCシグナル伝達経路の活性化に関与している。最近では、スフィンゴリピド代謝物質即ちスフィンゴシン-1-リン酸（SPP）が、細胞外作用及び細胞内作用を伴う新規な脂質第2メッセンジャーとして浮上してきた（コハマ，T. ら（1998）J. Biol. Chem. 273:23722-23728）。細胞外では、SPPはGプロテイン結合受容体EDG-I（内皮由来Gプロテイン結合受容体）に対するリガンドである。細胞内では、SPPは細胞の成長、生存、運動性及び細胞骨格変化を調整する。SPPレベルは、特にD-エリトロ-スフィンゴシンをSPPにリン酸化するようなスフィンゴシンキナーゼが調整する。細胞シグナル伝達におけるスフィンゴシンキナーゼの重要性は、血小板派生成長因子（PDGF）、神経成長因子及びPKCの活性化を含む種々の刺激がスフィンゴシンキナーゼの活性化によってSPPの細胞レベルを増加させるという事実と、酵素の拮抗阻害剤がPDGFによって細胞増殖誘導を選択的に阻害するという事実によって示される（前出のコハマの文献）。

【0018】

細胞内リン酸化の新規なレギュレータ及びそれをコードするポリヌクレオチドの発見は、神経疾患、細胞増殖異常及び自己免疫/炎症疾患の診断、予防並びに治療の際に有益な新規な成分を与えることによって本技術分野における要求に応える。

【0019】

（発明の概要）

本発明は、集合的には「HRIP」、個別には「HRIP-1」、「HRIP-2」、「HRIP-3」、「HRIP-4」、「HRIP-5」、「HRIP-6」、「HRIP-7」、「HRIP-8」、「HRIP-9」、「HRIP-10」、「HRIP-11」、「HRIP-12」、「HRIP-13」及び「HRIP-14」と呼ばれるような、実質上精製されたポリペプチドである細胞内リン酸化反応のレギュレータに特徴がある。或る側面において本発明は、（a）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少

なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドを提供する。或る例では、配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチドを提供する。

【0020】

また、本発明は(a)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドをコードする実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施例では、ポリペプチドは配列番号15乃至28からなる群から選択される。

【0021】

更に、本発明は(a)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドをコードする実質上単離されたポリヌクレオチドと機能的に結合したプロモータ配列からなる組換えポリヌクレオチドを提供する。或る例では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。また別の例では、本発明は組換えポリヌクレオチドからなる遺伝形質転換体を提供する。

【0022】

また、本発明は(a)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14から

なる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または (d) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、(a) 組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、(b) そのように発現したポリペプチドを受容する過程とからなり、組換えポリヌクレオチドは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からなる。

【0023】

更に、本発明は (a) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90% の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または (d) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドに特異結合する実質上単離された抗体を提供する。

【0024】

更に、本発明は (a) 配列番号 15 乃至 28 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列、(b) 配列番号 15 乃至 28 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 90% の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド配列、または (d) (b) に相補的なポリヌクレオチド配列からなる実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。或る例では、ポリヌクレオチドは少なくとも 60 の連続したヌクレオチドからなっている。

【0025】

更に、本発明はサンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは (a) 配列番号 15 乃至 28 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列、(b) 配列番号 15 乃至 28 からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 90% の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド配列、または (d) (b) に相補的なポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド配列を有する

。検出方法は、(a) サンプル中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列からなる少なくとも16の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、(b) ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、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ような条件下で、プローブはポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。或る例では、プローブは少なくとも30の連続したヌクレオチドからなっている。別の実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチドからなっている。

【0026】

更に本発明は、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とからなる医薬品成分を提供する。有効量のポリペプチドは、(a) 配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる。更に本発明は、機能性HRIPの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程からなる方法を提供する。

【0027】

また、本発明は(a) 配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) 配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とからなる。或る例では、本発明は機能性HRIPの発現低下に関連す

る疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程からなる方法を提供する。

【0028】

更に、本発明は (a) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90% の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または (d) 配列番号 1 乃至 14 からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とからなる。或る例で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とからなる医薬品成分を提供する。別の例では、機能性HRIPの過剰発現に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程からなる方法を提供する。

【0029】

更に本発明は、標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。標的ポリヌクレオチドは、配列番号 15 乃至 28 からなる群から選択した配列からなる。スクリーニング方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、(b) 標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とからなる。

【0030】

(発明を実施するための形態)

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明が限定されるものではなく、改変可能であるということを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施例を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ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併せて理解された

い。

【0031】

請求の範囲及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その（この）」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のものを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には単数または複数の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物等についても言及しているのである。

【0032】

本明細書中で用いる全ての専門用語及び科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料及び方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明に関係があるであろう細胞、プロトコル、試薬及びベクターについて説明及び開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

【0033】

定義

「HRIP」は、実質上精製されたHRIPのアミノ酸配列であって、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動物の種から得たもので、任意の天然物、合成物、半合成物或いは組換え物を起源とするものを指す。

【0034】

「アゴニスト」の語は、HRIPの生物学的活性を強化または擬態する分子を指す。アゴニストの例として、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはHRIPと直接相互作用することによって、或いはHRIPが関与する生物学的経路の構成要素に作用することによって、HRIPの活性を調節する。

【0035】

「対立遺伝子変異体」は、HRIPをコードする遺伝子の別の形態である。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1の突然変異から作製し得る。また、変異RNAまたはポリペプチドからも作製し得る。ポリペプチドの構造または機能は、変異することもしないこともある。遺伝子は、天然の対立遺伝子変異体を全く有しないか、1若しくは数個の天然の対立遺伝子変異体を有し得る。一般に対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は、ヌクレオチドの自然欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で1若しくは数回生じ得る。

【0036】

HRIPをコードする「変異(altered)」核酸配列は、種々のヌクレオチドを欠失、挿入または置換する核酸配列を有し、HRIPと同一またはHRIPの機能的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドを産出する。この定義に含まれるのは、HRIP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或いは検出困難な多型現象と、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列のための正常な染色体遺伝子座以外の遺伝子座に占めるような、対立遺伝子変異体に対する不適切或いは不測のハイブリダイゼーションである。コードされたタンパク質も「変異」し得るものであり、サイレント変化を生ぜしめて結果的に機能的に等価なHRIPとなるようなアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含み得る。計画的アミノ酸置換は、HRIPの生物学的また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/または両親媒性特性の類似性に基づき行い得る。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あり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとスレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

【0037】

「アミノ酸」または「アミノ酸配列」の語は、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またはその断片を指し、天然または合成分子を指す。ここで、「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に会合する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

【0038】

「増幅」は、核酸配列の追加複製に関連する。増幅は通常、当業者によく知られたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を用いて行う。

【0039】

「アンタゴニスト」の語は、HRIPの生物学的活性を阻害或いは弱める分子を指す。アンタゴニストとしては、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子またはその他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはHRIPと直接相互作用することによって、或いはHRIPが関与する生物学的経路の構成要素に作用することによって、HRIPの活性を調節する。

【0040】

「抗体」の語は、無損傷免疫グロブリンやその断片、例えば F_a 、 $F(ab')_2$ 及び F_v フラグメントを指すが、これらはエピトープの決定基と結合することができる。HRIPポリペプチドを結合する抗体は、無損傷ポリペプチドを用いるか或いは免疫抗原として感心のある小ペプチドを含む断片を用いるかして調製することができる。動物（マウス、ラット、ウサギ等）を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、翻訳または化学合成されたRNAに由来し得るもので、好みに応じて担体タンパク質に接合することも可能である。通常用いられる担体であってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）等がある。結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

【0041】

「抗原決定基」の語は、特定の抗体と接触している分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域または3

次元構造)に特異結合する抗体の産生を誘導し得る。抗原決定基は、抗体に結合するための無損傷抗原(即ち免疫応答を誘導するために用いられる免疫原)と競合し得る。

【0042】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」鎖と塩基対を形成することが可能な任意の成分を指す。アンチセンス成分には、DNAや、RNAや、ペプチド核酸(PNA)や、ホスホロチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸等の修飾されたバックボーン連鎖を有するオリゴヌクレオチドや、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖等の修飾された糖類を有するオリゴヌクレオチドや、或いは5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシン等の修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドがある。アンチセンス分子は、化学合成または転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が形成した天然の核酸配列と塩基対を形成し、転写または翻訳を妨害する二重鎖を形成する。「負」若しくは「マイナス(-)」の語がアンチセンス鎖を、「正」若しくは「プラス(+)」がセンス鎖を指すことがある。

【0043】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能また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、天然、組換えまたは合成のHRIP、或いはその任意のオリゴペプチドの能力であって、適切な動物または細胞において特定の免疫反応を誘導して特定の抗体と結合し得る能力を指す。

【0044】

「相補(的)」または「相補性」の語は、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドの、塩基対形成による自然結合を指す。例えば、配列「5'A-G-T3'」は、相補配列「3'T-C-A5'」に結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸が結合しているだけの「部分的」なものであるか、或いは一本鎖分子間に完全な相補性が存在するような「完全」なものであり得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に著しい影響を与える。この

ことは、核酸鎖間の結合に依存する増幅反応において、またペプチド核酸 (PNA) 分子の設計及び使用において特に重要である。

【0045】

「所定のポリヌクレオチド配列からなる成分」及び「所定のアミノ酸配列からなる成分」は、概して所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列からなる任意の成分を指す。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。HRIPまたはHRIP断片をコードするポリヌクレオチドからなる成分は、ハイブリダイゼーションプローブとして利用することができる。このプローブは凍結乾燥状態で保存し得るものであり、糖質等の安定化剤と会合し得る。ハイブリダイゼーションにおいては、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) 及びその他の構成要素 (例えばデンハート液、脱脂粉乳、サケの精子のDNA等) を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

【0046】

「コンセンサス配列」は、不必要な塩基を分離するために再配列し、XL-PCRキット (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) を用いて5'方向、3'方向のいずれか一方向或いは両方向に伸長させ、更に再配列した核酸配列を指す。或いは、断片アセンブルのコンピュータプログラムを用いて、1若しくは数個のIncyteクローンの、場合によっては1若しくは数個のパブリックドメインESTの、オーバーラップした配列から組み立てた核酸配列を指す。コンピュータプログラムの例としては、GELVIEW断片アセンブルシステム (GCG, Madison WI) が挙げられる。伸長及びアセンブルの両方を行ってコンセンサス配列を決定する配列もある。

【0047】

「保存的なアミノ酸置換」は、置換がなされた時に元のタンパク質の特性を殆ど損なわないような置換、即ちタンパク質の構造と特に機能が保存され、そのような置換による大きな変化がない置換を指す。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換され得るアミノ酸と、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

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

保存アミノ酸置換では通常、(a)置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えば β シートや α ヘリックス構造、(b)置換部位における分子の電荷または疎水性、及び/または(c)側鎖の大部分を保持する。

【0048】

「欠失」は、結果的に1若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドが失われてなくなるようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0049】

「誘導体」の語は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の化学修飾を指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチド配列の化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持し

てい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)、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドから少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持しているプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

【0050】

「断片」は、HRIPまたはHRIPをコードするポリヌクレオチドの固有部分であって、親配列と同一配列であるが親配列よりも長さが短い配列を指す。断片は、画定された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5～1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸（またはポリペプチドの最初の25%または50%）から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

【0051】

配列番号15乃至28の断片には、固有のポリヌクレオチド配列領域が含まれる。この領域は、配列番号15乃至28を特異的に同定するものであり、例えば同一ゲノム中の配列番号15乃至28以外の配列とは異なるものである。配列番号15乃至28の断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術において、或いは関連するポリヌクレオチド配列から配列番号15乃至28を区別する類似の方法において有用である。配列番号15乃至28の断片の正確な長さ及び断片に対応する配列番号15乃至28の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0052】

配列番号1乃至14の断片は、配列番号15乃至28の断片によってコードさ

れる。配列番号1乃至14の断片には、配列番号1乃至14を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、配列番号1乃至14の断片は、配列番号1乃至14を特異認識する抗体を産出するための免疫原性ペプチドとして有用である。配列番号1乃至14の断片及び断片に対応する配列番号1乃至14の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0053】

「類似性」の語は、相補性の程度を指す。類似性には、部分類似性と完全類似性がある。「類似性」の語の代わりに「相同性」を用いることもある。同一の配列が標的核酸にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害するような部分相補配列は、「実質上類似」と称する。完全相補配列の標的配列へのハイブリダイゼーションの阻害は、緩やかなストリンジェント条件下で、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、溶液ハイブリダイゼーション等）を用いて検定し得る。実質上類似の配列また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条件下で、完全類似（同一）配列が標的配列に結合することに対して競合し、この結合を阻害し得る。これは、緩やかなストリンジェント条件が非特異結合を許容することを意味するものではない。緩やかなストリンジェント条件では、2つの配列相互の結合が特異的（即ち選択的）相互作用であることが必要なためである。非特異結合の不存在下では、部分的に相補性が欠失している（例えば類似性または相同性が約30%以下である）ような第2標的配列を用いて試験することができる。非特異結合の不存在下では、実質上類似の配列またはプローブは第2非相補的標的配列にハイブリダイズしない。

【0054】

ポリヌクレオチド配列に適用される「相同率」または「相同%」の語は、標準化された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以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、2つの配列をより有意に比

較できる。

【0055】

ポリヌクレオチド配列間の相同率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定できる。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、一式の分子生物学分析プログラム（DNASTAR, Madison WI）である。CLUSTAL Vについては、Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153及びHiggins, D.G. ら (1992) CABIOS 8:189-191の文献に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対をなすアラインメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「類似率」として相同率を報告する。

【0056】

或いは、米国国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のBasic Local Alignment Search Tool（BLAST）が一般的に用いられ、且つ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している（Altschul, S.F. ら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410）。このアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>）からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列を対で直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn と 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、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータとし

て設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (1999年5月7日)を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

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

【0057】

相同率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）配列長さと比較して測定し得る。或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された配列から得られた断片（例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または200の連続したヌクレオチドの断片）の長さと比較して相同率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、相同率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0058】

高度の相同性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上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生成し得ることを理解されたい。

【0059】

ポリペプチド配列に適用される「相同率」または「相同%」の語は、標準化された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以上のポリペプチド配列間で一致する残基の割合を意味する。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の酸性度及び疎水性を保存

するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

【0060】

ポリペプチド配列間の相同率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているような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できる（既に説明したのでそれを参照されたい）。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定する。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスを選択する。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として相同率を報告する。

【0061】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア式を用いてもよい。例えばポリペプチド配列を2つ1組で比較をする場合、デフォルトパラメータとして設定されたblastpと共に「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を使用してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

【0062】

相同率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）ポリペプチド配列の長さと比較して測定し得る。相同率は、配列或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された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または150の連続した残基の断片）の長さと比較して相同率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、或る長さであってその長さに対して相

同率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0063】

「ヒト人工染色体」(HAC)は直鎖状の小染色体であり、6 kb ~ 10 MbのサイズのDNA配列を含み、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が含まれている。

【0064】

「ヒト化抗体」の語は、非抗体結合領域におけるアミノ酸配列はヒト抗体により近づくように変異させた抗体分子であって、本来の結合能力はそのまま保持しているような抗体分子を指す。

【0065】

「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下で塩基対を形成することによって、一本鎖ポリヌクレオチドが相補的鎖とアニーリングするプロセスを指す。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、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を決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合(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。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定する。許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニーリング許容条件は、例えば約6×SSC、約1%(w/v)のSDS及び約100 µg/mlの変性サケ精子DNAの存在下で温度68 において成立する。

【0066】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特異配列の融点(T_m)より約5 ~ 20 低くなるように選択する。この T_m は、所定のイオン強度及びpHの下で、完全に一致す

るプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrook ら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYに記載されており、特に2巻の9章を参照されたい。

【0067】

本発明の、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに対する高ストリンジェンシー条件には、約 $0.2 \times \text{SSC}$ 及び約1%のSDS存在下で約68℃において1時間の洗浄条件が含まれる。或いは、65℃、60℃、55℃または42℃の温度で行ってもよい。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約 $0.1 \sim 2 \times \text{SSC}$ の範囲で変化し得る。通常は、遮断剤を用いて非特異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 $\mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子DNAがある。特定条件下で、例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約35~50%v/vの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、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、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

【0068】

「ハイブリダイゼーション複合体」の語は、相補的塩基対間の水素結合の形成力によって2つの核酸配列間に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、溶解状態で形成し得る(C_0t または R_0t 解析等)。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、或いは他の適切な基質であって細胞若しくはその核酸が固定される基質)に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

【0069】

「挿入」及び「付加」の語は、1若しくは数個のアミノ酸残基またはヌクレオチド配列を各々付加するようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を

指す。

【0070】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患または遺伝性疾患に関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞及び全身の防御系に作用し得る種々の因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、その他のシグナル伝達分子の発現によって特徴づけることができる。

【0071】

「マイクロアレイ」の語は、基質上の異なるポリヌクレオチドの配置を指す。

【0072】

「要素」または「アレイ要素」の語は、マイクロアレイの環境において、基質の表面上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。

【0073】

「調節(する)」の語は、HRIPの活性の変化を指す。調節することによって例えば、HRIPのタンパク質活性、結合特性その他の生物学的、機能的または免疫学的特性が増大または低下し得る。

【0074】

「核酸」及び「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」及び「核酸配列」の語は、ゲノム起源または合成起源のDNAまたはRNAであって一本鎖または二本鎖であるか或いはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るようなDNAまたはRNAや、ペプチド核酸(PNA)や、任意のDNA様またはRNA様物質を指すこともある。

【0075】

「機能的に結合した」は、第1核酸配列が第2核酸配列と機能的な関係があるように配置された状態を指す。例えば、プロモータがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモータはそのコード配列に機能的に結合している。同一の読み枠内で2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、一般に、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。

【0076】

「ペプチド核酸」(PNA)は、アンチセンス分子または抗遺伝子物質であって、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、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドからなるものを指す。末端のリジンは、成分に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の拡張を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

【0077】

「プローブ」は、HRIP、HRIPの相補配列またはこれらの断片をコードする核酸配列を指し、同一核酸配列、対立遺伝子核酸配列または関連する核酸配列の検出に用いられる。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に結合したものである。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ある。

【0078】

「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、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に延在し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による核酸配列の増幅(及び同定)に用い得る。

【0079】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるために長めのプローブ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及びプライマーを用いてもよい。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。表、図面及び配列リストを含む本明細書に裏付けされた任意の長さのヌクレオチドを用いることができるものと理解されたい。

【0080】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. ら, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innisら (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego CA等を参照されたい。PCRプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA) を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

【0081】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのに有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(マサチューセッツ州ケンブリッジのWhitehead Institute/MITゲノム研究センターから一般向けに入手可能)ではユーザーが「ミスプライミング・ライブラリ」をインプットすることができ、ここでプライマー結合部位として避けたい配列はユーザーが指定する。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。(後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、各自のソースから得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい。) PrimerGenプログラム(英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能)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し

、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存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の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイ要素として、或いは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

【0082】

「組換え核酸」は天然の配列ではない配列であり、或いは人為的に組み合わせなければ離隔している配列の2以上のセグメントを人為的に組み合わせで産出した配列を有する配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばの Sambrookらの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモータ配列に機能的に結合した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、ベクターの不可欠な要素であって例えばある細胞を形質転換するために用いられるようなものであり得る。

【0083】

或いはこのような組換え核酸は、ウィルスベクターの不可欠な要素であって例えばワクシニアウィルスに基づくものであり得る。ワクシニアウィルスは組換え核酸が発現する哺乳動物のワクチン接種に用いるもので、哺乳動物の防御免疫応答を誘導する。

【0084】

DNA配列に関する「RNA等価物」は、発生した窒素塩基チミンが全てウラシルに置換されていることと、糖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースから構成されていることを除いて、参照DNA配列と同一のヌクレオチド線形配列から構成されている。

【0085】

「サンプル」の語は、その最も広い意味で用いられる。HRIPをコードする核酸若しくはその断片、またはHRIP自体を含む疑いのあるサンプルは、体液や、細胞から単離された細胞、染色体、細胞小器官または膜からの抽出物や、細胞や、溶解しているか基質に結合しているゲノムDNA、RNAまたはcDNAや、組織や、組織ブリント等から構成され得る。

【0086】

「特異結合」または「特異的に結合する」の語は、タンパク質またはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然成分または合成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（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存してい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の存在が、抗体に結合している標識されたAの量を低減させる。

【0087】

「実質上精製された」の語は、自然環境から取り除かれ、或いは単離または分離された核酸またはアミノ酸配列であって、自然に会合するその他の構成要素の少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、最も好ましいのは少なくとも約90%が遊離しているものを指す。

【0088】

「置換」は、1若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドを各々別のアミノ酸またはヌクレオチドに置換することを意味する。

【0089】

「基質」は、任意の好適な固体または半固体の支持体を指すものであって、膜、フィルタ、チップ、スライド、ウェハ、ファイバー、磁性非磁性ビーズ、ゲル、管、プレート、ポリマー、微細粒子、毛管が含まれる。基質は、壁、溝、ピン、チャンネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基質表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0090】

「形質転換」は、外来性のDNAが宿主細胞に入り込み、宿主細胞を変化させるプロセスを表す。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、ウィルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された」細胞の語には、限られた時間内に挿入されたDNAやRNAを発現するような一時的に形質転換された細胞のみならず、安定的に形質転換された細胞であってその中に挿入されたDNAが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であるものも含まれる。

【0091】

ここで用いる「遺伝形質転換体」とは任意の有機体であり、限定するものではないが動植物を含み、有機体の1若しくは数個の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られている形質転換技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウィルスの導入によって行う。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いはin vitro受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような有機体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookら（1989）等の参考文献に与えられている。

【0092】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、

デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (1999年5月7日)を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体(前述)、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多形性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの交互スプライシングによって通常多数の或いは僅かな数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種相互に異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多形性変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。また、多形性変異体は、1つのヌクレオチド塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する「単一ヌクレオチド多形性」(SNP)を含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

【0093】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の相同性を有するポリペプチド配列として画定される。ここで、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (1999年5月7日)を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の相同性を示し得る。

【0094】

発明

本発明は、新規なヒトの細胞内リン酸化反応のレギュレータ(HRIP)、HRIPをコードするポリヌクレオチド、並びにこれらの成分を神経疾患、細胞増殖異常及び自己免疫/炎症不全の診断、治療又は予防のために利用する方法の発見に基づくものである。

【0095】

表1は、HRIPをコードする完全長のヌクレオチド配列の構築に用いたIncyteクローンを示す。列1及び列2は、ポリペプチド及びポリヌクレオチドの配列番号（SEQ ID NO）を各々示している。列3はIncyteクローンを示しており、各HRIPをコードする核酸はここで同定されたものである。列4はcDNAライブラリを示しており、列3のクローンはここから単離したものである。列5は、Incyteクローン及びこれに対応するcDNAライブラリを示している。cDNAライブラリが示されていないIncyteクローンは、プールされているcDNAライブラリから得た。列5のIncyteクローンをを用いて各HRIPのコンセンサスヌクレオチド配列を構築した。列5のIncyteクローンは、ハイブリダイゼーション技術における断片として有用である。

【0096】

表2の列は、本発明の各ポリペプチドの様々な特性を示している。列1は配列番号（SEQ ID NO）を、列2は各ポリペプチド中のアミノ酸残基の数を、列3は潜在的なリン酸化部位を、列4は潜在的なグリコシル化部位を、列5はサイン（signature）配列及びモチーフを有するアミノ酸残基を、列6はBLAST分析によって同定された相同配列、列7は分析方法と場合によってはその分析方法が利用できる検索可能なデータベースを示している。列7の分析方法を用いて、配列相同性及びタンパク質モチーフから各ポリペプチドの特徴付けを行った。

【0097】

表3の列は、組織特異性と、HRIPをコードするヌクレオチド配列に関係がある疾患、障害または症状とを示している。表3の列1はヌクレオチドの配列番号を、列2は列1のヌクレオチド配列の断片を示している。これらの断片は例えば、配列番号15乃至28を同定し、配列番号15乃至28と関連するポリヌクレオチド配列を区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅の技術において有用である。配列番号15乃至27では、これら断片によりコードされるポリヌクレオチドは、例えば免疫原性ペプチドとして有用である。列3は、HRIPを発現する組織全体に対するHRIP発現割合として、組織カテゴリーを示している。列4は、HRIPを発現する組織全体に対する割合として、HRIPをコードするヌクレオチド

配列に関係がある疾患、障害または症状を示している。列5は、各cDNAライブラリをサブクローニングするために用いたベクターを示している。

【0098】

表4の列ではcDNAライブラリの作製に用いた組織の説明を示している。HRIPをコードするcDNAのクローンはcDNAライブラリから単離したものである。列1は、ヌクレオチドの配列番号を、列2はクローン単離起源であるcDNAライブラリを、列3は列2のcDNAライブラリに関連する組織の起源その他の記述的情報を示している。

【0099】

本発明には、HRIPの変異体も含まれる。好適なHRIPの変異体のアミノ酸配列は、HRIPアミノ酸配列と少なくとも約80%、または少なくとも約90%、或いは約95%もの相同性を有し、HRIPの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するような変異体である。

【0100】

本発明には、HRIPをコードするポリヌクレオチドも含まれる。或る例では、HRIPをコードする配列番号15乃至28からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列が本発明に含まれている。配列番号15乃至28のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列と同等の価値を有しているが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくシリボースから構成されている。

【0101】

本発明には、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列も含まれる。具体的には、そのようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約80%、または少なくとも約90%、或いは約95%もの相同性を有する。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、HRIPの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するアミノ酸配列をコードし得る。

【0102】

当業者であれば、遺伝暗号の縮重の結果、HRIPをコードする多数のポリヌクレ

オチド配列（既知の遺伝子または天然の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないポリヌクレオチド配列もある）が作り出され得ることは理解できよう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって作り出され得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。これらの組合せは、天然のHRIPのポリヌクレオチド配列に適用されるような標準トリプレット遺伝暗号を基に作られるものであり、このような変異は全て明確に開示されているものと考えられる。

【0103】

HRIP及びその変異体をコードするヌクレオチド配列は通常、好適に選択されたストリンジェントな条件下で天然のHRIPのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、HRIPまたはその誘導体であって実質上異なるコドンの使用法があるもの、例えば天然に存在しないコドンの封入があるものをコードするヌクレオチド配列を作り出すことは有益であろう。宿主が特定のコドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択することが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えることなくHRIP及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質上変更する別の理由には、天然の配列から作製される転写物より好ましい、例えば半減期が長いなどの特性を有するRNA転写物の作製がある。

【0104】

本発明には、HRIP、HRIP誘導体及びこれらの断片をコードするDNA配列又はこれらの断片を完全に合成化学によって作製することも含まれる。作製後、本技術分野でよく知られている試薬を用いて、この合成配列を任意の様々な入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いてHRIPまたはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘導し得る。

【0105】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載のポリヌクレオチド配列、特に配列番号15乃至28で示される配列及びそれらの断片にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列も含まれる。（Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399-407、Kimmel, A.R. (1987) Method

s Enzymol. 152:507-511.等を参照。)ハイブリダイゼーション条件は、アニーリング条件及び洗浄条件を含めて「定義」に記載した。

【0106】

DNAシーケンシングの方法は本技術分野でよく知られており、本発明の何れの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用いることができ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD)において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Perkin-Elmer) 等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Perkin-Elmer)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) または本技術分野でよく知られている他の方法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本技術分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する。(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.等を参照。)

【0107】

HRIPをコードする核酸配列を、部分的ヌクレオチド配列を利用し且つ本技術分野でよく知られているPCR法をベースにした種々の方法を用いて伸長させ、プロモータ及び調節要素等の上流配列を検出することができる。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッド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方法である。(Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2:318-322等を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用い

て環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列からなる制限断片から得る (Triglia, T.ら (1988) Nucleic Acids Res 16:8186等を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に關与している。(Lagerstrom, M.ら(1991) PCR Methods Applic 1:111-119等を参照。)この方法では、PCRを行う前に多重制限酵素の消化及び連結反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については本技術分野で知られている。(Parker, J.D.ら (1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoterFinder (商標) ライブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、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/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72 で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

【0108】

完全長cDNAをスクリーニングする際は、大きめのcDNAを含むようにサイズ選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、ランダムに初回抗原刺激を受けたライブラリは、しばしば遺伝子の5'領域を有する配列を含み、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラリは、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【0109】

市販されているキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なったヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで活性化される蛍光色素と、放出された波長の検出に利用するCCDカメ

ラとを有し得る。出力及び光の強度は、適切なソフトウェア（Perkin-Elmer社の GENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATOR等）を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNAの小片のシーケンシングに特に適している。

【0110】

本発明の別の実施例では、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を、適切な宿主細胞内でHRIP、HRIPの断片またはその機能的等価物を発現させるような組換えDNA分子内でクローニングし得る。遺伝暗号固有の宿重に起因して、実質的同一或いは機能的等価のアミノ酸配列をコードするような別のDNA配列を作製してHRIPの発現に利用し得る。

【0111】

種々の目的でHRIPがコードする配列を変えるために、本発明のヌクレオチド配列を本技術分野で一般的に知られている方法を用いて組み換えることができる。ここで目的には、限定するものではないが遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、発現の調節がある。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド伸介定方向突然変異誘導を利用して、新規な制限部位の生成、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を行う突然変異を導入し得る。

【0112】

本発明のヌクレオチドは、MolecularBreedingTM（Maxygen Inc., Santa Clara CA. 米国特許第5,837,458号、Chang, C.-C.ら（1999）Nat. Biotechnol. 17:793-797、Christians, F.C.ら（1999）Nat. Biotechnol. 17:259-264、Cramer, A.ら（1996）Nat. Biotechnol. 14:315-319に記載）等のDNAシャッフリング技術の対象となり、HRIPの生物学的特性、例えば生物活性、酵素力、或いは他の分子や化合物との結合力等を変更または向上させ得る。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCR伸介再組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを生成するプロセ

スである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。このように、遺伝の多様性は「人為的」品種改良及び急速な分子の進化を経て創生される。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を再結合し、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と再結合し、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指図された制御可能な方法で最大化させることができる。

【0113】

別の実施例によれば、本技術分野でよく知られている化学的方法を用いて、HRIPをコードする配列の全部或いは一部を合成し得る。(Caruthers, M.H.ら (1980) Nucleic. Acids Symp. Ser 7:215-223、Horn, T.ら (1980) Nucleic. Acids Symp. Ser. 7:225-232等を参照。)或いは、化学的方法を用いてHRIPそれ自体またはその断片を合成し得る。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。(Roberge, J.Y.ら (1995) Science 269:202-204等を参照。)自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ(Perkin Elmer)を用いて達成し得る。更にHRIPのアミノ酸配列またはその任意の一部は、直接合成する間、または他のタンパク質から得た配列またはその任意の一部と結合する間、或いはその両方を行っている間に変更し、変異型ポリペプチドを生成することが可能である。

【0114】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製可能である。(Chiez, R.M.and F.Z. Regnier (1990) Methods Enzymol. 182:392-421等を参照。)合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる。(Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York, NY等を参照。)

【0115】

生物学的に活性なHRIPを発現させるために、HRIPをコードするヌクレオチド配

列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入することができる。好適な発現ベクターとは即ち好適な宿主内で挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含むベクターである。必要な要素には、ベクター及びHRIP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プロモータ、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列がある。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。固有開始シグナルを用いて、HRIPをコードする配列をより効果的に翻訳することが可能もある。このようなシグナルには、ATG開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。HRIPをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。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、インフレームの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含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。発現の効率は、用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを包含することによって高めることができる。(Scharf, D. ら (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162.等を参照。)

【0116】

当業者によく知られている方法を用いて、HRIPをコードする配列と、好適な転写及び翻訳調節要素とを含む発現ベクターを構築することが可能である。この方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術及びin vivo遺伝子組換え技術がある。(Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYの4, 8, 16-17章、Ausubel, F.M. ら. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NYの9, 13, 16章等を参照。)

【0117】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、HRIPをコードする配列を保持及び発現し得る。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウィルス発現ベ

クター（例えばバキュロウィルス）に感染した昆虫細胞系や、ウィルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウィルスCaMVまたはタバコモザイクウィルスTMV）または細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系などの微生物等がある。本発明は、使用する宿主細胞によって限定されるものではない。

【0118】

細菌系では、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて多数のクローニングベクター及び発現ベクターを選択し得る。例えば、HRIP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には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT 1 プラスミド (Life Technologies) などの多機能大腸菌ベクターを用いることができる。HRIPをコードする配列の、ベクターの多数のクローニング部位への連結反応によって、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を同定する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における in vitro 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう。(Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509.等を参照。) 多量のHRIPが必要な場合、例えば抗体を生成する場合などには、HRIPの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導T5バクテリオファージプロモータまたは誘導T7バクテリオファージプロモータを含むベクターが使用できる。

【0119】

酵母の発現系を使用してHRIPを生成し得る。 α 因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモータ等の構成型或いは誘導型のプロモータを含む多数のベクターが、酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは Pichia pastoris に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質を分泌或いは細胞内への保持のいずれかに誘導し、安定した増殖のために外来配列の宿主ゲノムへの組込みを可能にする。(前出のAusubel (1995) の文献、Bitter, G.A. ら (1987) Methods Enzymol.153:516-544、Scorer, C. A. ら (1994) Bio/Technology 12:181-1

44.等を参照。)

【0120】

植物系を使用してHRIPを発現することも可能である。HRIPをコードする配列の転写は、ウィルスプロモータ、例えば単独或いはTMV (タカマツ, N. (1987) *EMBO J* 6:307-311) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いられるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモータによって促進される。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモータまたは熱ショックプロモータを用いてもよい。(Coruzzi, G. ら (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680、Broglie, R. ら (1984) *Science* 224:838-843、Winter, J. ら (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105.等を参照。)これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とするトランスフェクションによって、植物細胞内に導入可能である。(『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp.191-196等を参照。)

【0121】

哺乳動物細胞においては、多数のウィルスベースの発現系を利用し得る。発現ベクターとしてアデノウィルスを用いる場合、HRIPをコードする配列は、後発プロモータ及び3連リーダー配列からなるアデノウィルス転写/翻訳複合体に連結反応され得る。可欠E1またはE3領域へウィルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でHRIPを発現する感染ウィルスを得ることが可能である。(Logan, J. and T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659を参照。)更に、ラウス肉腫ウィルス(RSV)エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【0122】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を輸送することもできる。治療目的のために約6 kb ~ 10 MbのHACを作製し、従来の輸送方法(リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル)で供給する。(Harrington, J.J. ら (1997) *Nat Genet.* 15:345-355.等を参照。)

【0123】

長期にわたり哺乳動物系内で組換えタンパク質を生成するためには、細胞株内のHRIPの安定発現が望ましい。例えば、発現ベクターであって複製発現因子、内在性発現因子、或いはその両者のウィルス起源を含むものと、同一或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用いて、HRIP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る。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約1～2日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0124】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、 tk^{-} 単純細胞のために用いられるヘルペスウィルスチミジンキナーゼ遺伝子と、 apr^{-} 細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある。(Wigler, M. ら (1977) *Cell* 11:223-232、Lowy, I. ら (1980) *Cell* 22:817-823等を参照。) また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えば $dhfr$ はメトトレキセートに対する耐性を与え、 neo はアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、 als はクロルスルフロンに対する耐性を、 pat はホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える。(Wigler, M. ら (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570、Colbere-Garapin, F. ら (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14 等を参照。) この他の選択可能遺伝子、例えば、代謝のための細胞要求を変える $trpB$ 及び $hisD$ は、文献に記載されている。(Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047-8051等を参照。) 可視マーカー、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、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特

定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である。(Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131等を参照。)

【0125】

マーカー遺伝子発現の存在 / 不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、HRIP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、HRIPをコードする配列を含む形質転換細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定することが可能である。または単一プロモータ制御下で、HRIPをコードする配列とタンデムにマーカー遺伝子を配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

【0126】

一般に、HRIPをコードする核酸配列を含み且つHRIPを発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーション、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出、定量、或いはその両方を行うための膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含むタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術がある。

【0127】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてHRIPの発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、本技術分野で公知である。このような技術の例としては、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、蛍光活性化細胞選別 (FACS) などが挙げられる。HRIP上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位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、競合結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、本技術分野で公知である。(Hampton, R. ら (1990) Serological Methods, a Laboratory Manual. APS Press. St Paul, MN, Sect. IV、Coligan, J. E. ら (1997) Current Protocols in Immunology,

Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY、Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humans Press, Totowa NJ等を参照。))

【0128】

多岐にわたる標識方法及び結合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。HRIPをコードするポリヌクレオチドに関連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或いはPCRプローブを産出する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR法がある。或いは、HRIPをコードする配列またはその任意の断片を、mRNAプローブを産出するためのベクターにクローニングすることも可能である。このようなベクターは、本技術分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、*in vitro*でRNAプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersham Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、U.S. Biochemical等から市販されている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、コファクター、阻害剤、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色素産生剤等がある。

【0129】

HRIPをコードするヌクレオチド配列を用いて形質転換した宿主細胞は、細胞培地からのタンパク質の回収及び発現に適した条件下で培養し得る。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、或いはその両者に依存する。当業者であれば理解し得るように、HRIPをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、原核細胞膜または真核細胞膜を透過するHRIPの直接分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できる。

【0130】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではな

いがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断するような翻訳後処理を利用して、タンパク質のターゲティング、折りたたみ、及び/または活性を特定することも可能である。翻訳後の活性のための固有の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞（例えば CHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等）は、American Type Culture Collection（ATCC、Bethesda, MD）から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確実にするように選択し得る。

【0131】

本発明の別の実施例では、HRIPをコードする天然の核酸配列、変更核酸配列または組換え核酸配列を、上記任意の宿主系において融合タンパク質の翻訳をもたらす異種配列に連結反応させることができる。例えば、市販されている抗体を用いて認識可能な異種部分を含むキメラHRIPタンパク質は、HRIP活性阻害剤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、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分も、市販されている親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、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）がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素（HA）は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、融合タンパク質を遺伝子操作し、HRIPが精製後に異種部分から切断され得るように、HRIPコード配列と異種タンパク質配列の間にタンパク質分解切断部位を含めることもできる。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のAusubel（1995）10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

【0132】

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またはコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて、放射能標識したHRIPの合成がin vitroで可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモータと機能的に結合したタンパク質コード配列の転写及び翻訳を結合する。翻訳は、放射能標識したアミノ酸前駆体、例えば³⁵Sメチオニンの存在の下で起こる。

【0133】

HRIPの断片は、組換え手法によって作製するのみならず、固相技術を用いた直接ペプチド合成によっても作製し得る (前出のCreighton, pp.55-60.等を参照。) タンパク質合成は、手作業で行うか自動化し得る。自動化合成は、例えば431Aペプチドシンセサイザ (Perkin Elmer) を用いて行うことが可能である。HRIPの種々の断片は別々に合成し、後から結合させて完全長分子を形成する。

【0134】

(治療)

化学的及び構造的類似性、例えば配列及びモチーフとの関連における類似性が、HRIPの領域と細胞内リン酸化反応のレギュレータ間に存在する。更にHRIPの発現は、神経組織と、癌その他の細胞増殖異常症と、炎症及び免疫応答とに密接に関連している。従ってHRIPは、神経疾患、細胞増殖異常症及び自己免疫異常症 / 炎症性疾患において或る役割を果たすものと考えられる。HRIPの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、HRIPの発現または活性を低下させることが望ましい。また、HRIPの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、HRIPの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0135】

従って、或る実施例において、HRIPの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にHRIPまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例として神経疾患が含まれ、その中には癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網

膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト-ヤコブ病及びガストマン-ストラウスラー-シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱その他の中枢神経系の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害(SAD)と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症(corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、また細胞増殖異常症も含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髓腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髓、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれ、また自己免疫異常症/炎症性疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、

骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウィルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれる。

【0136】

別の実施例では、HRIPまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むHRIPの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0137】

更に別の実施例では、実質的に精製されたHRIPを含む医薬品成分を好適な医薬用担体と共に患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むHRIPの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0138】

更に別の実施例では、HRIPの活性を調節するアゴニストを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むHRIPの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0139】

更に別の実施例では、患者にHRIPのアンタゴニストを投与して、HRIPの発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例には、上記した神経疾患、細胞増殖異常症及び自己免疫異常症 / 炎症性疾患がある。一実施態様においては、アンタゴニストとして直接的に、或いはHRIPを発現する細胞または組織に薬剤を輸送するターゲティングまたは輸送機構として間接的にHRIPと特異結合する抗体を用いることができる。

【0140】

別の実施例では、HRIPをコードするポリヌクレオチドの相補体を発現するベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むHRIPの発現

または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0141】

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来の医薬原理に従ってを選択し得る。治療薬と組み合わせることにより、上記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらし得る。この方法を用いることにより少量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

【0142】

HRIPのアンタゴニストは、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造し得る。具体的には、精製されたHRIPを用いて抗体を作るか、治療薬のライブラリをスクリーニングして、HRIPと特異結合するものを同定することが可能である。HRIPの抗体も、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造することが可能である。限定するものではないがこのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片及びFab発現ライブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。

【0143】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、その他を含む種々の宿主は、HRIP、またはHRIPの任意の断片またはオリゴペプチドであって免疫原性の特性を有するものを注入することによって免疫化することができる。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウム等のミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール等の界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG（カルメット - ゲラン杆菌）及びコリネバクテリウム - パルヴムが特に好ましい。

【0144】

HRIPに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、少なくとも約5のアミノ酸からなり、一般的には少なくとも約10のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり且つ小さな天然の分子の全アミノ酸配列を含むことが望ましい。HRIPアミノ酸の短い伸長部は、別のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシニアンの配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0145】

HRIPに対するモノクローナル抗体は、抗体分子を産生する任意の技術を用いて、培地内の連続した細胞株によって作製し得る。限定するものではないがこのような技術には、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ある。(Kohler, G. ら. (1975) Nature 256:495-497、Kozbor, D. ら (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42、Cote, R.J. ら (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030、Cole, S.P. ら (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120等を参照。)

【0146】

更に、「キメラ抗体」を作製するために開発した技術、例えば好適な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを用いることが可能である。(Morrison, S.L. ら. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855、Neuberger, M.S. ら (1984) Nature 312:604-608、タケダ, S. ら (1985) Nature 314:452-454等を参照。) 或いは、一本鎖抗体を産生するために説明された技術を適用し、本技術分野で知られている方法を用いて、HRIP特異性一本鎖抗体を産生し得る。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる。(Burt on D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137等を参照。)

抗体の産生は、リンパ球集団における in vivo 産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高

特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る。(Orlandi, R. ら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837、Winter, G. ら (1991) Nature 349:293-299等を参照。)

【0147】

HRIPのための特異結合部位を有する抗体を産生することもできる。例えば、限定するものではないがこのような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製される $F(ab')_2$ 断片と、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を減らすことによって作製されるFab断片とがある。或いは、Fab発現ライブラリを作製することによって、モノクローナルFab断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる(Huse, W.D. ら (1989) Science 256:1275-1281等を参照。)

【0148】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる免疫放射線アッセイまたは競合結合アッセイに対する数々のプロトコルは、本技術分野において公知である。このようなイムノアッセイは通常、HRIPとその特異性抗体間の複合体形成の計測に關与している。2つの非干渉性HRIPエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いるような、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合アッセイを利用してもよい(前出のPoundの文献)。

【0149】

ラジオイムノアッセイ技術と共に様々な方法、例えばスキャッチャード分析を用いて、HRIPに対する抗体の親和性を評価する。親和性は結合定数 K_a で表す。 K_a は、平衡状態においてHRIP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除した値であると定義する。ポリクローナル抗体は多様なHRIPエピトープに対する親和性が不均一であり、ポリクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、HRIP抗体の平均親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は特定のHRIPエピトープに対して単一特異的であり、モノクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が約 $10^9 \sim 10^{12}$ L/molの範囲にあるような高親和性抗体試薬は、HRIP抗体複合体が激しい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。Ka値が約 $10^6 \sim 10^7$ L/molの範囲にあるような低親和性抗体試薬は、HRIPが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製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. and Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0150】

ポリクローナル抗体試薬の抗体価及び結合活性を更に評価して、或る下流の適用例に対するこのような試薬の品質及び適性を決定することができる。例えば、少なくとも $1 \sim 2$ mg/ml、好ましくは $5 \sim 10$ mg/mlの特異抗体を含むポリクローナル抗体試薬は、HRIP抗体複合体を沈殿させる必要がある処理において通常用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である。(前出のCattyの文献、同Coliganらの文献等を参照)。

【0151】

本発明の別の実施例では、HRIPをコードするポリヌクレオチド、HRIPの任意の断片または相補配列を治療目的で 사용할 ことができる。ある実施形態では、HRIPをコードするポリヌクレオチドの相補配列がmRNAの転写を阻止するのに好適である場合にこれを使用し得る。具体的には、HRIP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し得る。従って、相補的分子または断片は、HRIP活性を調節するため、または遺伝子機能を調節するために使用し得る。このような技術は既に本技術分野ではよく知られており、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片を、HRIPをコードする配列のコード領域または制御領域に延在する様々な位置から設計することが可能である。

【0152】

レトロウィルス、アデノウィルス、ヘルペスまたはワクシニアウィルス由来の発現ベクターまたは様々な細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、標的器官、組織または細胞集団にヌクレオチド配列を輸送することができる。当業者によく知られている方法を用いて、HRIP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ようなベクターを作製することができる。(前出のSambrookらの文献、同Ausubelらの文献等を参照。)

HRIPをコードする高レベルのポリヌクレオチドまたはその断片を発現するような発現ベクターを用いて細胞または組織を形質転換することによって、HRIPをコードする遺伝子を遮断することができる。このような作製物を用いて、翻訳不可能なセンス配列またはアンチセンス配列を細胞内に導入することができる。このようなベクターは、DNA内に統合されない場合であっても内在性ヌクレアーゼによって機能が損なわれるまでmRNA分子を転写し続けることができる。一過性の発現は、非複製ベクターを用いた場合には1か月間以上続き、好適な複製要素がベクター系の一部である場合には更に長い間続くことがある。

【0153】

上記した通り、遺伝子発現の調節は、HRIPをコードする遺伝子の5'即ち調節領域を制御するべく相補配列またはアンチセンス分子(DNA、RNAまたはPNA)を設計することによって得ることが可能である。転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いることが可能であり、転写開始部位とは例えば開始部位から数えて約-10と約+10の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合のために十分に広がる二重らせんの能力を阻止するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載されている。(Gee, J.E. ら (1994) in: Huber, B.E. and B.I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, pp.163-177等を参照。)相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するべく設計することができる。

【0154】

リボザイムは酵素性RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、ヌクレオチド鎖切断に先立つ相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションが関与している。例えば、組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子は、

HRIPをコードする配列のヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒する。

【0155】

任意の潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含む、リボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。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、リボヌクレオチドが15～20の短いRNA配列を、オリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次的構造の特徴に対して評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの実施容易性をテストすることによって行うことができる。

【0156】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために本技術分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。任意の方法には、固相ホスホラミダイト化合物等のオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、HRIPをコードするDNA配列のin vitro及びin vivo転写によってRNA分子を産出し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモータを用いて多様なベクター内に組み入れることが可能である。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらcDNA作製物を、細胞株、細胞または組織内に導入することができる。

【0157】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにRNA分子を修飾することができる。限定するものではないが可能な修飾には、分子の5'末端、3'末端、あるいはその両方においてフランキング配列を追加したり、分子の主鎖内において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または2' Oメチルを使用したりすることが含まれる。この概念は、PNAの産出に固有のものであり、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内在性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル -、メチル -、チオ - 及び同様の修飾をしたものに加えて、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン (queosine)、ワイプトシン (wybutosine)

)等を包含することによる。

【0158】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、*in vivo*、*in vitro*及び*ex vivo*の使用に対して同程度に適している。*ex vivo*治療の場合、ベクターを患者から採取した肝細胞内に導入し、クローニング増殖して同一患者に自家移植で戻すことができる。トランスフェクション、リボソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる輸送は、本技術分野でよく知られている方法を用いて実行することができる。(Goldman, C.K. ら (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466.等を参照。)

上記の治療方法はいずれも、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル等の哺乳動物を含めて治療が必要な全ての対象に適用できる。

【0159】

本発明の追加実施例は、薬剤として許容できる担体と併せて、上記の任意の治療効果を得るための医薬品或いは無菌組成物の投与に関連する。このような医薬品成分は、HRIP、HRIPに対する抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはHRIP阻害剤から構成し得る。成分は、単体で投与するか、或いは少なくとも1の別の薬剤(例えば安定剤)と共に投与し得る。薬剤は、限定するものではないが生理食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、水など、任意の無菌の生体適合性医薬品担体中で投与し得る。成分は、患者に単独で、或いは他の薬剤、薬物またはホルモンと共に投与し得る。

【0160】

本発明に用いられる医薬品成分は、任意の数の経路によって投与することができ、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸がある。

【0161】

活性成分に加えてこれらの医薬品成分には、活性化合物を薬剤として許容できる好適な担体を有し得る。担体は、薬剤として使用可能なプレパレートへの活性化合物の処理を促進するような医薬品添加物及び補助剤からなる。製剤及び投与

の技術については、Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に詳細に記載されている。

【0162】

経口投与の医薬品成分は、本技術分野でよく知られている、薬剤として許容できる担体を用いて、経口投与に適した量で調剤することが可能である。このような担体を用いることによって、医薬品成分を患者が摂取できるように錠剤、丸薬、糖衣剤、カプセル剤、液状薬、ゲル状薬、シロップ剤、泥状物、懸濁液等として製剤することが可能となる。

【0163】

経口投与の医薬品製剤は、活性化合物を固形の薬品添加物と結合させ、その結果として得られた顆粒の混合物を（オプションで、すりつぶした後で）タブレットまたは糖衣錠のコアが得られるように処理することによって、得ることができる。所望に応じて好適な医薬品添加物を加えることができる。好適な医薬品添加物には糖質またはタンパク質賦形剤があり、具体例としてはラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトールを含む糖類と、トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモその他の植物から採取されるでんぷんと、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またはカルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロースと、アラビアゴム及びトラガカントゴムを含むゴムと、ゼラチン及びコラーゲン等のタンパク質とが挙げられる。例えば架橋結合したポリビニルピロリドン、かんてん、アルギン酸またはアルギン酸塩（例えばアルギン酸ナトリウム）等の崩壊剤または可溶化剤を所望に応じて添加してもよい。

【0164】

糖衣錠コアは、濃縮糖溶剤等の好適なコーティングと共に用い得る。好適なコーティングにも、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール（carbopol）ゲル、ポリエチレングリコール、及び/または二酸化チタン、ラッカー溶剤及び好適な有機溶媒または溶剤混合液等がある。製品の同定のため或いは活性化合物の量即ち投与量を示すために、染料または色素を錠剤または糖衣錠に添加してもよい。

【0165】

経口投与に用いることができる医薬品製剤には、ゼラチンでできた密封ソフトカプセル及びグリセロールやソルビトール等のコーティングのみならず、ゼラチンでできたプッシュ・フィット型 (push-fit) カプセルもあり得る。プッシュ・フィット型カプセルには、ラクトースまたはスターチ等の賦形剤や結合材と、タルクまたはステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤と、更にオプションで安定剤と混合されたような活性成分を含めることが可能である。ソフトカプセルにおいては、安定剤を用いて或いは安定剤を用いずに、脂肪油、溶液またはポリエチレングリコール溶液等の好適な溶液中で活性化合物が溶解或いは懸濁し得る。

【0166】

非経口投与に適した医薬品製剤は、水溶液中で、好適にはハンス液、リンガー液、生理緩衝食塩水等の生理学的に適合性のあるバッファ中で製剤することができる。水性の注入懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストラン等の懸濁液の粘性を高める物質を有し得る。更に好適な油性の注入懸濁液として活性化合物の懸濁液を製剤し得る。好適な親水性溶液または培地には、ごま油等の脂肪油またはオレイン酸エチル、トリグリセリド、リボソーム等の合成脂肪酸エステルがある。輸送のために非脂質ポリカチオンアミノポリマーを用いてもよい。高濃度溶液の調剤が可能となるように、化合物の溶解性を高める好適な安定剤または薬剤をオプションで懸濁液に含めてもよい。

【0167】

局所または鼻腔投与のために、特定の障壁に浸透する好適な浸透剤が製剤に用いられる。このような浸透剤は、本技術分野で通常に知られている。

【0168】

本発明の医薬品成分は、本技術分野でよく知られている方法、例えば従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣化、湿式粉碎、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥処理等を用いて製造し得る。

【0169】

医薬品成分は塩として製剤され、限定するものではないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等の多くの酸と共に形成可能である。塩は、対応する遊離塩基形に比べて水溶剤または他のプロトン溶剤に溶けやすい。別

の場合では、薬剤は、1 mM ~ 50 mM ヒスチジン、0.1 % ~ 2 % スクロース、及び/または2 % ~ 7 % マンニトールを含み、pHの範囲が4.5 ~ 5.5であり、使用前に緩衝剤と結合するような凍結乾燥粉末とすることができる。

【0170】

医薬品成分は、調合が完了した後に、指定された症状の治療のために適当な容器に詰めて標識することができる。HRIPを投与するための投与の量、頻度及び方法がラベルに書かれることになる。

【0171】

本発明に用いるのに適した医薬品成分には、意図する目的を達成するために効果的な量の活性成分を含む組成物が含まれる。効果的な服用量は、当業者が自己の能力の範囲内で決定する。

【0172】

任意の組成物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において、先ず治療の有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量及び投与経路を決定することができる。

【0173】

治療上の有効投与量は、症状や容態を回復させるような活性成分量を参考にする。そのような活性成分の例としては、HRIPまたはその断片、HRIPの抗体、HRIPのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤がある。薬用有効度及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED₅₀（集団の50%の医薬的有效量）またはLD₅₀（集団の50%の致死量）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比は、治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。高い治療指数を示すような医薬品成分が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路に

よって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

【0174】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定するであろう。効果的なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持するべく、投与量及び投与を調節する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の通常健康状態、患者の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の配合、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い医薬品成分は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3～4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与してよい。

【0175】

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1～100,000 µgであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及び輸送方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、タンパク質または阻害剤に対する処方とは異なる、ヌクレオチドに対する処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの輸送は、特定の細胞、状態、位置等に特異的なものとなることになる。

【0176】

(診断)

別の実施例では、HRIPの発現によって特徴付けられる疾患の診断のために、或いはHRIPやHRIPのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤で治療を受けている患者をモニターするためのアッセイにおいて、HRIPを特異的に結合する抗体が用いられることがある。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で調合される。HRIPの診断アッセイには、抗体及び標識を利用してヒトの体液において或いは細胞や組織のエキスにおいてHRIPを検出する方法が含まれる。抗体は、修飾して或いは修飾しないで使用し、レポーター分子の共有結合性或いは非共有結合性の接着によって標識化し得る。多様なレポーター分子が本技術分野で知られており、それらを用いることができる。幾つかのレポーター分子については上記した。

【0177】

HRIPを測定するための様々なプロトコル、例えばELISA、RIA、FACS等が本技術分野において知られており、HRIP発現の修正レベル或いは異常レベルを診断する基準を提供する。複合体の形成に適した条件下でヒト対象等の正常な哺乳動物対象から採取した体液または細胞とHRIPに対する抗体とを結合させることにより、HRIP発現の正常値または標準値が決定される。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。対象内で発現したHRIPの量、制御、検体からの病変サンプルを標準値と比較する。標準値と対象との偏差が疾患を診断するパラメータとなる。

【0178】

別の実施例によれば、HRIPをコードするポリヌクレオチドを診断目的に用いることもできる。用いられることができ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、そしてPNAが含まれる。ポリヌクレオチドは、検体におけるHRIPの発現が疾患と相関し得るような該検体における遺伝子発現の検出及び定量に用いることができる。診断アッセイは、HRIPの不在、存在及び過剰発現を測定するために、そして治療インターベンション中にHRIPレベルの調製を監視するために用いることができる。

【0179】

ある実施形態では、HRIPをコードする核酸配列を同定するために、HRIPまたは近縁の分子をコードする、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ることができる。プローブが同定するのはHRIP、突然変異体または関連配列をコードするような、天然に存在する配列のみであるか否かは、プローブの特異性及びハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェンシーによって決定されることになる。ここで、プローブの特異性とは、プローブが高特異領域（例えば5'調節領域）からなるのか、低特異領域（例えば保存されたモチーフ）からなるのかということである。

【0180】

プローブはまた、関連する配列の検出にも用いることができ、その配列はHRIPをコードする任意の配列と少なくとも50%の相同性を有し得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAとすることができ、配列番号15乃

至28の配列、或いはHRIP遺伝子のプロモータ、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0181】

HRIPをコードするDNAに対する特異的ハイブリダイゼーションプローブを作製する方法には、HRIPまたはHRIP誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を、mRNAプローブを作製するためのベクターにクローニングする方法が含まれる。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識され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ために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーターの集団によって標識され得る。レポーター集団の例としては、 ^{32}P または ^{35}S 等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。

【0182】

HRIPの発現に関連する疾患を診断するために、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列を用いることができる。限定するものではないがこのような疾患の例として限定するものではないがこのような疾患の例として神経疾患が含まれ、その中には癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性及びウィルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウィルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト-ヤコブ病及びガストマン-ストラウスラー-シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱その他の中枢神経系の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、

内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害（SAD）と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症（corticobasal degeneration）、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、また細胞増殖異常症も含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病（MCTD）、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髓腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髓、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれ、また自己免疫異常症／炎症性疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群（AIDS）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウィルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれる。

HRIPをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法、ノーザン法、ドットプロット法やその他の膜ベースの技術と、PCR法と、ディップスティック（dipstick）法、ピン及びマルチフォーマットELISA様アッセイと、変異HRIPの発現を検出するために患者から採取した体液または組織を利用するマイクロアレイとにおい

て使用し得る。このような定性または定量方法は、本技術分野で公知である。

【0183】

或る形態では、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて、HRIPをコードするヌクレオチド配列が有効であろう。HRIPをコードするヌクレオチド配列は標準法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液または組織のサンプルに添加することができる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者サンプルのシグナル量が制御サンプルと比べて著しく変化している場合は、サンプル内のHRIPをコードするヌクレオチド配列の変異レベルは関連する疾患の存在を示している。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、或いは個々の患者の治療を監視するために用いることもできる。

【0184】

HRIPの発現に関連する疾患の診断基準を提供するために、発現のための正常あるいは標準概要を確立する。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件下で、動物或いはヒトの正常な対象から抽出した体液或いは細胞を、HRIPをコードする配列またはその断片と結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な対象から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た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患の存在を確定する。

【0185】

疾患の存在が確定され治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な対象に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返されるであろう。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示すことができる。

【0186】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供したりし得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法または積極的な治療法を早くから利用して、癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。

【0187】

HRIPをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドを追加的に診断上利用することは、PCRの利用に關与し得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いはin vitroで産出し得る。オリゴマーは、好ましくはHRIPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはHRIPをコードするポリヌクレオチドと相補的ポリヌクレオチドの断片を含み、最適条件下で特定の遺伝子や条件を識別するべく利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェント条件下で、近縁のDNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

【0188】

HRIPの発現を定量するためにも用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅（coamplification）及び標準曲線から得た結果の補間が含まれる。（Melby, P.C.ら（1993）J. Immunol. Methods, 159:235-244、Duplaa, C.ら（1993）Anal. Biochem. 212:229-236等を参照。）目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または非色応答によって定量が迅速になるようなハイスループットフォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

【0189】

更に別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、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、多数の遺伝子の発現レベルを同時に監視し、遺伝的変異体、突然変異及び多型現象を同定することができる。この情報は、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、治療薬剤の活性を開発及び監視するために有用である。

【0190】

マイクロアレイは本技術分野でよく知られている方法を用いて準備し、使用し、そして分析する。(Brennan, T.M. ら (1995) の米国特許第5,474,796号、Schena, M. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler ら (1995) のPCT出願第W095/251116号、Shalon, D. ら (1995) のPCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. ら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. ら (1997) の米国特許第5,605,662号等を参照。)

本発明の別の実施例では、天然のゲノム配列をマッピングする際に有効なハイブリダイゼーションプローブを産出するため、HRIPをコードする核酸配列を用いることが可能である。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる。(Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154等を参照。)

【0191】

蛍光原位置ハイブリッド形成法(FISH)は、他の物理的染色体マッピング技術及び遺伝地図データと相関し得る。(Heinz-Ulrich, ら (1995) 前出のMeyers, pp. 965-968.等を参照。) 遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man(OMIM)のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上のHRIPをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、その疾患に関係するDNAの領域を画定するのに役立つであろう。健常者、保有者、感染者の三者間における遺伝子配列の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0192】

確定した染色体マーカーを用いた結合分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位置ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。マウス等、別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていない場合でも関連するマーカーが明らかに

なるであろう。新規の配列は、物理的マッピングによって染色体アームに割付け可能である。このことは、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患を調査する研究者にとって価値ある情報である。疾患または症候群が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域に対するいかなるマッピングも、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を表すことができる。(Gatti, R.A. ら (1988) Nature 336:577-580等を参照。) 転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0193】

本発明の別の実施例では、種々の薬剤スクリーニング技術を以って化合物のライブラリをスクリーニングするために、HRIP、HRIPの触媒作用断片、免疫原断片、またはそのオリゴペプチドを用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになる。HRIPとテストされる薬剤との結合複合の形成は計測できる。

【0194】

別の薬剤スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる。(Geysen, ら (1984) のPCT出願番号 W084/03564等を参照。) この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基質上で合成する。試験用化合物は、HRIP或いはその断片と反応させ、洗浄する。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合したHRIPを検出する。精製したHRIPはまた、上記した薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

【0195】

別の実施例では、競合薬スクリーニングアッセイを用いることができる。このアッセイでは、HRIPを結合することができる中和抗体が、HRIPを結合するための

試験化合物と特異的に競合する。この方法では、抗体が、1若しくは数個の抗原決定因子をHRIPと共有するペプチドの存在を検出する。

【0196】

別の実施例では、新規技術が現在知られているヌクレオチド配列の特性（限定するものではないがトリプレット遺伝暗号及び特異的塩基対の相互作用等を含む）に依存するのであれば、依然として発展すべきいかなる分子生物学技術においても、HRIPをコードするヌクレオチド配列を用いることができる。

【0197】

詳細説明を追加しなくとも、本技術分野の技術者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。従って、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的にすぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

【0198】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第60/125,593号、同第60/135,049号、同第60/143,188号は、言及することをもって本明細書の一部となす。

【0199】

（実施例）

1 cDNAライブラリの作製

RNAは、Clontech社から購入し、或いは表4に列記した組織から単離した。ホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解した組織もあり、また、ホモジナイズしてフェノールまたは好適な変性剤の混合液に溶解した組織もある。変性剤の混合液は、例えばフェノールとグアニジニウムイソチオシアネートの単相溶液であるTRIZOL (Life Technologies) 等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムにおいて遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0200】

RNAの純度を高めるため、RNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNアーゼでRNAを処理した。殆どのライブラリでは

、オリゴd(T)連結常磁性粒子 (Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子 (QIAGEN, Valencia CA) またはOLIGOTEX mRNA精製キット (QIAGEN) を用いて、ポリ(A+) RNAを単離した。別法では、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A)PURE mRNA精製キット (Ambion, Austin TX) を用いて組織溶解物からRNAを直接単離した。

【0201】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、本技術分野で公知の推奨方法または類似の方法を用いて、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERScriptプラスミドシステム (Life Technologies) を用いてcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した。(前出のAusubel, 1997, unit 5.1-6.6等を参照。) 逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ(300~1000 bp) 選択は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech)、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは、好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位に連結反応させた。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド (Stratagene)、pSPORT1プラスミド (Life Technologies) またはpINCY (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA) 等である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5 α 、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

【0202】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いたin vivo切除によって、或いは細胞溶解によって、プラスミドを宿主細胞から回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミ

ドキットの中から少なくとも1つを用いて、プラスミドを精製した。沈殿させた後、0.1 mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥せずに、4で保管した。

【0203】

別法では、ハイスルーブットフォーマットにおいて直接結合PCR法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミド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は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)及びFluoroskan II蛍光スキャナー(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

【0204】

3 シークエンシング及び分析

cDNAのシーケンス反応は、標準的方法或いはハイスルーブット装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー(Perkin-Elmer)またはPTC-200 サーマルサイクラー(MJ Research)をHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific)またはMICROLAB 2200(Hamilton)液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシーケンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬またはABIシーケンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit(Perkin-Elmer)に与えられた試薬を用いて準備した。cDNAのシーケンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム(Molecular Dynamics)か、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シーケンシングシステム(Perkin-Elmer)か、或いはその他の本技術分野でよく知られている配列解析システムを用いた。cDNA配列の読み枠は、標準的方法(前出のAusubel, 1997, unit 7.7)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、本実施例5に記載した方法で配列を伸長させた。

【0205】

cDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、当業者によく知られたアルゴリ

ズムを利用するソフトウェアの組合せを用いて構築し、解析した。利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略、適用可能な説明、引用文献、閾値パラメータを表5に示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表5の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な引用文献であり、全文献はそっくりそのまま引用を以って本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は2つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す（スコアが高ければ高いほど2配列間の相同性が高くなる）。配列の解析は、MACDNASIS PROソフトウェア（日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA）及びLASERGENEソフトウェア（DNASTAR）を用いて行った。

【0206】

ポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリA配列を除去することにより、またあいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング、及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、BLAST、FASTA及びBLIMPSに基づくプログラムを用いて、プログラム中の注釈を得るべく、公共のデータベース、例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAMの選択に対する配列を問い合わせた。配列はPhred、Phrap及びConsedに基づくプログラムを用いて完全長のポリヌクレオチド配列に構築し、GenMark、BLAST及びFASTAに基づくプログラムを用いてオープンリーディングフレームに対してスクリーニングした。対応する完全長アミノ酸配列を誘導するべく完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳し、その後、GenBankデータベース（上記）、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びProsite等のデータベース、PFAM等のHidden Markov Model（HMM）ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対する問合せによって完全長配列を分析した。HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を解析する確率的アプローチである。（Eddy, S.R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照。）

【0207】

完全長ポリヌクレオチド及びアミノ酸配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、配列番号15乃至28からのポリヌクレオチド配列の断片を同定するためにも使用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅に有用な約20～約4000のヌクレオチドの断片は、上記「発明」の項で説明した。

【0208】

4 ノーザン分析

ノーザン分析は、転写された遺伝情報の存在を検出するために用いられる実験技術であり、標識されたヌクレオチド配列の、特定の細胞種または組織からのRNAが結合される膜へのハイブリダイゼーションに関与している。（前出のSambrook, 7章、同Ausubel, F.M. ら, 4章及び16章等を参照。）

【0209】

BLASTに適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Pharmaceuticals) 等のヌクレオチドデータベースにおいて同一または関連分子を検索する。ノーザン分析は、多数の膜系ハイブリダイゼーションよりも断然速い。更に、特定の同一を厳密な或いは相同的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準はプロダクトスコアであり、次式で定義される。

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

プロダクトスコアは、2つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両方を考慮している。例えば、プロダクトスコアが40であれば誤差1～2%以内の精度で一致し、プロダクトスコアが70であれば正確に一致することになる。類似分子は通常、15～40のプロダクトスコアを示す分子を選択することにより同定する。それ以下のスコアでは、関連分子を同定し得る。

【0210】

ノーザン分析の結果は、HRIPをコードする転写物が作出されたライブラリの分布パーセンテージとして報告される。分析は、器官/組織及び疾患によるcDNAライブラリのカテゴリー分類に関与している。器官/組織のカテゴリーには、心血管、皮膚、発生、内分泌、胃腸、造血/免疫、筋骨格、神経、生殖及び泌尿器がある。疾患/病状のカテゴリーには、癌、炎症、外傷、細胞増殖、神経、貯留（

pooled) が含まれる。カテゴリー毎に目的の配列を発現するライブラリ数を数え、それを全カテゴリーのライブラリ数で除した。組織特異発現及び疾患/病状特異発現のパーセント値を表3に示す。

【0211】

5 ポリヌクレオチドをコードするHRIPの伸長

配列番号15乃至28の完全長の核酸配列は、完全長分子の適切な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該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

【0212】

配列を伸長するために、選択されたヒトcDNAライブラリを用いた。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマー或いはプライマーのネステッドセットを設計した。

【0213】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research, Inc.) を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液には、DNA鋳型、各プライマー200nmol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バッファと、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) が含まれていた。プライマー対PCI A、PCI Bに対して用いたパラメータは次の通りである。

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、4を20回繰り返す

ステップ6 : 68 で5分間

ステップ7 : 4 で保存

プライマー対T7、SK+に対しては、上記パラメータに代え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、4を20回繰り返す

ステップ6 : 68 で5分間

ステップ7 : 4 で保存

【0214】

1X TEに溶解したPICOGREEN定量試薬 (0.25% (v/v) PICOGREEN, Molecular Probes, Eugene OR) 100 μ lと、希釈していないPCR産物0.5 μ lとを不透明な蛍光光度計プレート (Coming Costar, Acton MA) の各穴に分配し、DNAを試薬と結合可能なようにさせることによって各穴内のDNA濃度の測定を行った。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量するべくプレートをFluoroskan II (Lab systems Oy, Helsinki, Finland) でスキャンした。反応混合物のアリコート5 ~ 10 μ lを1%アガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。

【0215】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウィルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI) を用いて消化し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) への再連結反応前に音波処理またはせん断した。ショットガン・シークエンシングのために、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で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega) で消化した。伸長させたクローン

をT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA) を用いてpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で処理して制限部位の張出部 (overhang) を満たし、コンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を抗生物質含有培地上で選択し、個々のコロニーを選択してLB/2x carb液体培地の384穴プレート内において37℃で一晩培養した。

【0216】

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PCRによってDNAを増幅した。その際用いたパラメータは次の通りである。

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、4を29回繰り返す

ステップ6 : 72℃で5分間

ステップ7 : 4℃で保存

DNAは、上記のPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) によって定量した。DNAの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド (1:2, v/v) で希釈し、DYENAMIC energy transfer sequencing primer及びDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer) を用いてシーケンシングした。

【0217】

同様に、上記手順と、伸長のために設計されたオリゴヌクレオチドと、適切なゲノムライブラリを用いて、5'調節配列を得るべく、配列番号15乃至28のヌクレオチド配列が用いられる。

【0218】

6 個々のハイブリダイゼーションの標識及び使用

配列番号15乃至28から得たハイブリダイゼーションプローブを利用して、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNAをスクリーニングする。約20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対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250 μCi と、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) を結合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストランビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。

Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba IまたはPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【0219】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytan Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは、40℃で16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば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に一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィーまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

【0220】

7 マイクロアレイ

化学結合方法及びインクジェット装置を用いて、基質の表面上でアレイ要素を合成することが可能である。(前出のBalteschweiler等を参照。) ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線の、機械的または化学的結合手順を用いて基質の表面に要素を配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき

、任意の適正な数の要素を含み得る。ハイブリダイゼーション後にハイブリダイズされていないプローブを取り除き、スキャナーを用いて蛍光のレベル及びパターンを決定する。スキャンしたイメージを分析することで、マイクロアレイ上で要素にハイブリダイズする各プローブの相補性の度合い及び相対発生量を算定できる。

【0221】

完全長のcDNA、発現遺伝子標識（EST）またはこれらの断片は、マイクロアレイの要素を構成し得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片を、LASERGENEソフトウェア（DNASTAR）等の本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。本発明の核酸配列の1つに対応する完全長のcDNA、EST、またはこれらの断片、或いは本発明に関連するcDNAライブラリから任意に選択したcDNAを、ガラススライド等の好適な基質に配置する。cDNAは、例えばUV架橋剤を利用してスライドに固定してから、熱処理及び化学処理を施し、最後に乾燥させる（Schena, M. ら. (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. ら (1996) Genome Res. 6:639-645等を参照。）蛍光プローブを調製して、基質上の要素にハイブリダイゼーションするために用いる。基質は、上記した方法で分析する。

【0222】

8 相補的ポリヌクレオチド

HRIPをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的配列は、天然のHRIPの発現を検出し、低下させ、または阻害するために用いられる。約15～約30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア（National Biosciences）、及びHRIPをコードする配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモータがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、相補的オリゴヌクレオチドを設計して、HRIPをコードする転写物にリボソームが結合するのを阻害する。

【0223】

9 HRIPの発現

HRIPの発現及び精製は、細菌またはウィルスをベースにした発現系を用いて行うことができる。細菌でHRIPが発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモータを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモータには、lacオペレーター調節要素に関連するT5またはT7バクテリオファージプロモータ及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモータが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピルβ-Dチオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導されるとHRIPを発現する。真核細胞でのHRIPの発現は、一般にバキュロウィルスとして知られているAutographica californica核多面性ウィルス (AcMNPV) を昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に感染させて行う。バキュロウィルスの可欠ポリヘドリン遺伝子を、相同的組換え、或いは転移プラスミドの仲介に関与する細菌仲介遺伝子転移のどちらかによって、HRIPをコードするcDNAと置換する。ウィルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモータによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウィルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda (Sf9) 昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウィルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(Engelhard, E. K.ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照。)

【0224】

殆どの発現系では、融合タンパク質としてHRIPを合成するのに例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) またはペプチドエピトープ標識、例えばFLAGや6-Hisを用いる。これらを用いることにより、未精製細胞溶解物から組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製を迅速に1ステップで行うことができる。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Pharmacia Biotech)。精製後、GSTの部分を特定の開発部位においてHRIPからタンパク質分解的に切断することが可能である。FLAGは8アミノ酸のペプチド

であり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いて免疫親和性精製を可能にする。6 ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂 (QIAGEN) 上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のAusubel (1995) 10章、16章に記載されている。これらの方法で精製したHRIPを直接用いて以下のアッセイを行うことができる。

【0225】

1.0 HRIP活性の実証

HRIPのキナーゼ活性は、 γ -標識 ^{32}P -ATPを用いた好適な基質のリン酸化反応と、 β ラジオアイソトープカウンタを用いた摂取放射能の定量によって決定する。HRIPは、タンパク質基質、 ^{32}P -ATP及び好適なキナーゼバッファを用いてインキュベートする。産物内に取り込まれた ^{32}P は電気泳動によって遊離 ^{32}P -ATPから分離され、取り込まれた ^{32}P を計数する。回収された ^{32}P の量は、このアッセイにおけるHRIPのキナーゼ活性に比例する。プロテインキナーゼによってリン酸化された特定のアミノ酸残基は、加水分解されたタンパク質のホスホアミノ酸分析によって決定する。

【0226】

或いは、HRIPのプロテインホスファターゼ活性を、p-ニトロフェニルリン酸 (PNPP) の加水分解によって決定する。HRIPは、37℃で0.1% b-メルカプトエタノールの存在下で、pH 7.5のHEPESバッファ内でPNPPと共に60分間インキュベートする。この反応は1.0NのNaOHを添加することで停止する。PNPPの加水分解によって生じた410nmにおける光の吸光度の増加は、分光光度計を用いて測定する。光の吸光度の増加は、本アッセイのHRIP活性に比例する (Diamond, R.H. (1994) Mol. Cell Biol. 14:3752-3762)。

【0227】

1.1 機能的アッセイ

HRIP機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのHRIPをコードする配列の発現によって評価する。cDNAを、cDNAを高いレベルで発現する強いプロモータを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。選り

抜きのベクターには、pCMV SPORTプラスミド (Life Technologies) 及びpCR 3.1プラスミド (Invitrogen) が含まれ、どちらもサイトメガロウィルスプロモータを有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 μ gの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1 ~ 2 μ gのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取り込みを検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、プロピジウムヨウ化物によるDNA染色によって計測される核DNA内容物の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変化、及び蛍光複合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M. G. (1994) Flow Cytometry Oxford, New York, NY.に記述がある。

【0228】

遺伝子発現におけるHRIPの影響は、HRIPをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのいずれかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64または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) の保存領域と結合する。形質転換細胞と非形質転換細胞は、ヒトIgGまたはCD64に対する抗体 (DYNAL, Lake Success, NY) で覆われた磁気ビーズを用いて有効に分離することができる。mRNAは、本技術分野で公知の方法で細胞から精製することができる。HRIPその他の目的の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析或いはマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0229】

1.2 HRIP特異抗体の産生

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE ; Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 182:488-495等を参照) または他の精製技術を用いて実質上精製されたHRIPを用いて、標準プロトコルでウサギを免疫化して抗体を産出する。

【0230】

或いは、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてHRIPアミノ酸配列を解析し、免疫原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。適切なエピトープ、例えばC末端付近或いは隣接する親水性領域にあるエピトープの選択については、本技術分野で公知である。(前出のAusubel, 1995, 11章等を参照。)

【0231】

通常、長さ約15残基のオリゴペプチドを、ABI 431A ペプチドシンセサイザ (Perkin-Elmer) を用いてFmocケミストリを用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫原性を高める(前出のAusubel, 1995 等を参照)。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド-KLM複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗HRIP活性を検査するには、ペプチドまたはHRIPを基質に結合し、1%BSAを用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素で標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0232】

1.3 特異抗体を用いた天然のHRIPの精製

天然または組換えHRIPを、HRIP特異抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、抗HRIP抗体を活性化クロマトグラフィー用樹脂、例えばCNBr活性化セファロース (Amersham Pharmacia Biotech) と共有結合させることにより構築する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

【0233】

HRIPを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、HRIPを優先的に吸着する条件下（例えば、界面活性剤が存在する高イオン強度バッファ）でカラムを洗浄する。抗体とHRIPの結合を破壊する条件（例えばpH 2～3のバッファ、或いは尿素またはチオシアン酸塩イオン等の高濃度のカオトロップ剤）でカラムを溶出させ、HRIPを回収する。

【0234】

1.4 HRIPと相互作用する分子の同定

HRIPまたは生物学的に活性であるHRIP断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬で標識する。（Bolton A.E. and W.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539等を参照。）マルチウェルプレートの穴の中に予め配列しておいた候補分子を、標識したHRIPと共にインキュベートして洗浄し、標識したHRIP複合体を有する全ての穴をアッセイする。HRIP濃度を変えて得たデータを用いて、候補分子とのHRIPの数、親和性及び会合の値を計算する。

【0235】

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発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行い得る。本発明について説明するにあたり特定の好適実施例に関連して説明を行ったが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載されている本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲内にあるものとする。

【0236】

（表の簡単な説明）

表1は、HRIPをコードする完全長の配列をアセンブルするために用いた、ポリペプチド配列及びヌクレオチド配列の配列番号（SEQ ID NO）、クローン識別番号（クローンID）、cDNAライブラリ及びcDNA断片を示す。

【0237】

表2は、潜在モチーフと、相同配列と、HRIPの解析に用いた方法、アルゴリズム及び検索可能なデータベースとを含む各ポリペプチド配列の特徴を示す。

【0238】

表3は、各核酸配列の選択された断片と、ノーザン分析によって決定された各核酸配列の組織特異的発現パターンと、これらの組織に関連した疾患、異常症または症状と、各DNAのクローニング先のベクターとを示す。

【0239】

表4は、cDNAライブラリの作製に用いた組織を示す。HRIPをコードするcDNAクローンはここから単離した。

【0240】

表5は、HRIPの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、引用文献及び閾値パラメータと共に示す。

【表1】

表1-1

タンパク質 SEQ ID NO	ヌクレオチド SEQ ID NO	クローンID	ライブラリ	断片
1	15	480457	LIVRBCT01	154793R6 (THP1PLB02), 480457H1 (LIVRBCT01), 480457X12R1 (LIVRBCT01), 480457X13R1 (LIVRBCT01), 1817968F6 (PROSNOT20), 3149829R6 (ADREN004), 3766714H1 (BRSTNOT24)
2	16	563663	NEUTLPT01	285464X4 (EOSIHET02), 285464X8 (EOSIHET02), 563663H1 (NEUTLPT01)
3	17	1425842	BEPINON01	120376R6 (MUSCNOT01), 1425842H1 (BEPINON01), 1571293F1 (UTRSNOT05), 1851503F6 (LUNGFEET03), 3596860F6 (FIBPNOT01)
4	18	2349047	COLSUCT01	1718442F6 (BLADNOT06), 1960909R6 (BRSTNOT04), 1960909T6 (BRSTNOT04), 2349047H1 (COLSUCT01), SBHA02478F1, SBHA02364F1, SBHA00749F1
5	19	2415617	HNT3AZT01	471426R6 (WMLR1DT01), 941244R1 (ADREN0T03), 1466986F1 (PANCUT02), 1519153H1 (BLADTUT04), 2301362R6 (BRSTNOT05), 2415617H1 (HNT3AZT01), 2482778F6 (SMCANOT01), 4410796H1 (MONOTXT01)
6	20	3815186	TONSNOT03	1759852R3 (PITUNOT03), 3815186H1 (TONSNOT03), SBJA02796F1
7	21	5504544	BRABDIR01	046651X31 (CORNNOT01), 179527X7 (PLACNOB01), 905771T1 (COLNNOT08), 1291784F6 (PGANNOT03), 1291784T6 (PGANNOT03), 1542946X14 (PROSTUT04), 2759765R6 (THP1AZS08), 2908366F6 (THYMNOT05), 5504544H1 (BRABDIR01)
8	22	1511326	LUNGNOT14	1511326H1 (LUNGNOT14), 1511326F1 (LUNGNOT14), 1511326T1 (LUNGNOT14), 1511326T6 (LUNGNOT14), 2922438F6 (SININOT04), 3029015H1 (HEARFET02), 5167787H1 (MUSCUNT01)
9	23	1519120	BLADTUT04	1519120H1 (BLADTUT04), 1519120F6 (BLADTUT04), 1519120T6 (BLADTUT04)

【表2】

表1-2

タンパク質 SEQ ID NO	ヌクレオチド SEQ ID NO	クローンID	ライブラリ	断片
10	24	1673761	BLADNOT05	1673761H1 (BLADNOT05), 1673761F6 (BLADNOT05), 1673761T6 (BLADNOT05), 2024815R6 (KERANOT02), 2111282H1 (BRAITUT03), 2655266F6 (THYMNOT04), 4178671H1 (BRAINOT22), 5307169H1 (MONOTXT02), 1424569T1 (BEPINOT01)
11	25	1270442	BRAINOT09	401269R6 (TMLR3DT01), 1270442H1 (BRAINOT09), 1672906F6 (BLADNOT05), 2596974H1 (OVARUT02), 2794801H1 (NPOLNOT01), 3289454H1 (BONRFET01), 3293681H1 (TLXJINT01), 3377437H1 (PENGNOT01), 3744502H1 (THYMNOT08)
12	26	1877133	LEUKNOT03	076555H1 (THPIPEB01), 1422142F6 (KIDNNOT09), 1877133H1 (LEUKNOT03), 2403383F6 (SMCANOT01), 2483377H1 (SMCANOT01)
13	27	2636759	BONTNOT01	2636759F6 (BONTNOT01), 2636759H1 (BONTNOT01), SBUA02427D1
14	28	2716815	THYRNOT09	078565R1 (SYNORAB01), 079174R1 (SYNORAB01), 1272190X14 (TESTTUT02), 1272190X23R1 (TESTTUT02), 1272190X24R1 (TESTTUT02), 2680827H1 (SINIUCT01), 2716815H1 (THYRNOT09), 2716815F6 (THYRNOT09), 3272956H1 (PROSBPT06)

【表3】

表2-1

タンパク質 SEQ ID NO	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコ シル化部位	サイン(signature)配列	相同配列	分析方法
1	482	T160 S4 T211 S217 T313 T430 S52 S67 T140 S146 S201 S217 S224 S258 S275 S378 T467 T472	N57 N184 N353	二重特異性ホスファターゼ 触媒部位: E321-D461	二重特異性タンパク質 チロシンホスファターゼ (ドブネズミ) (g1185552)	BLAST MOTIFS PFAM BLOCKS PRINTS
2	190	T35 T55 S131 S2 S183 Y147	N102	プロテインキナーゼATP 結合部位: L39-K62 プロテインキナーゼ触媒部位: I154-L166 真核性プロテインキナーゼ ドメイン: I33-I186	DRAK2キナーゼ (ヒト) (g3834356)	BLAST MOTIFS PFAM PRINTS
3	455	S252 S89 S234 S258 S268 S302 S342 S346 S364 S429 S434 S61 S96 S302 S410 T414 S415 Y343	N97 N159 N265 N409	プロテインキナーゼATP結合部位: V129-I141 真核性プロテインキナーゼ ドメイン: L16-I257 ロイシンジッパー L294-L322	セリン/トレオニン プロテインキナーゼZIP (ヒト) (g561543)	BLAST MOTIFS PFAM PRINTS
4	485	S166 S283 S16 T167 S208 S242 T267 S283 T292 S306 T354 S278 T336 T370 S402 T412 S449 S483	N66 N400 N421 N481	プロテインキナーゼ触媒部位: L105-L117 真核性プロテインキナーゼ ドメイン: R26-L247	セリン/トレオニン プロテインキナーゼRICK (ヒト) (g3123887)	BLAST MOTIFS PRINTS PFAM
5	384	T130 T54 S181 T205 S371	N137	ジアシルグリセロールキナーゼ 触媒ドメイン: R16-L153	スフィンゴシンキナーゼ (ハツカネズミ) (g3659694)	BLAST PFAM BLOCKS

【表4】

表2-2

タンパク質 SEQ ID NO	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコ シル化部位	サイン(signature)配列	相同配列	分析方法
6	81	T37 S38 T52 T73 T54		プロテインキナーゼC末端ドメイン: D33-F77	プロテインキナーゼ (ドブネズミ) (g206191)	BLAST PFAM
7	721	S40 S239 S640 T61 S68 S176 S196 S205 T241 S251 T416 T432 T655 T696 S49 T90 S230 T234 T235 S251 T255 T277 T416 S447 S484 S549 T696	N30 N274 N275 N297 N316 N572	プロテインキナーゼATP結合部位: L400-K423 プロテインキナーゼ触媒部位: I513-L525 真核性プロテインキナーゼドメイン: I394-L650 ホルボールエステル/ジアシル グリセロール結合ドメイン: H108-C157	プロテインキナーゼC mu (ヒト) (g438373)	BLAST MOTIFS PFAM PRINTS
8	249	S3 S4 T38 T137 S150 T64 T75 S107 S119 S196	N204	チロシン特異タンパク質 ホスファターゼ活性部位: V88-I100 チロシン特異タンパク質 ホスファターゼ: V88-S98	推定チロシンホスファ ターゼ (ヒト) (g6650693)	MOTIFS BLOCKS BLAST
9	146	S125 S131		真核性プロテインキナーゼドメイン: Y12-L105	mCASK-A (ハツカネズミ) (g3087816)	MOTIFS BLAST PFAM
10	524	T21 T31 S77 S190 S237 S311 S511 S198 S207 T417 S440	N189	真核性プロテインキナーゼドメイン: P247-P492 プロテインキナーゼサイリン: L253-K276, L368-L380	プロテインキナーゼ 同族体 (シロイヌナズナ) (g2244835)	MOTIFS BLAST PFAM PRINTS PROFILES/SCAN

【表5】

表2-3

タンパク質 SEQ ID NO	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコ シレ化部位	サイン(signature)配列	相同配列	分析方法
11	509	S224 T45 S80 T95 T216 T262 S307 S317 T325 S343 T388 S434 T452 S466 S7 S212 S282	N208	タンパク質ホスファターゼpp2a 調整サブユニット、 代替スプライシング： S56-E462 タンパク質ホスファターゼpp2a 調整サブユニット： S56-V312 EFハンドカルシウム結合ドメイン： D335-L347	タンパク質 ホスファターゼ2A 72 kDa 調整サブユニット (ヒト) (g195222)	MOTIFS BLAST- GenBank BLAST- PRODOM BLAST-DOMO
12	142	S18 T26 T77 T4 T116	N114		TAK1 TGF-β 活性 キナーゼ (ツメガエル) (g3057036)	MOTIFS BLAST- GenBank
13	221	S21 S208 T2 T69 T170 S9 S16		チロシン特異タンパク質 ホスファターゼ活性部位： V146-L158 二重特異性タンパク質 チロシンホスファターゼ： D121-L201 VH-1型二重特異性 ホスファターゼ： E57-V202	チロシン/セリン ホスファターゼ (ヒト) (g181840)	MOTIFS BLAST- GenBank BLAST- PRODOM BLAST-DOMO HMMER-PFAM PROFILES CAN
14	462	T119 S302 S390 S36 S59 S163 T167 T175 S177 T187 S218 S276 T309 S311 S434 T443 S35 S87 S200 T242 S334 S360 T436	N57	チロシンキナーゼ： L139-P427	多ホルモンのに 調整された遺伝子 (ドブネズミ) (g1561667)	MOTIFS BLAST- GenBank BLAST-DOMO

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.
 BANDMAN, Olga
 TANG, Y. Tom
 YUE, Henry
 HILLMAN, Jennifer L.
 BAUGHN, Mariah R.
 AZIMZAI, Yalda
 LU, Dyung Aina M.
 AU-YOUNG, Janice

<120> REGULATORS OF INTRACELLULAR PHOSPHORYLATION

<130> PF-0683 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/125,593; 60/135,049; 60/143,188
 <151> 1999-03-18; 1999-05-20; 1999-07-09

<160> 28

<170> PERL Program

<210> 1
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 480457CD1

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

```

Met Glu Tyr Asn Lys Ser His Ile Gln Gly Ala Val His Ile Asn
185 190 195
Cys Ala Asp Lys Ile Ser Arg Arg Arg Leu Gln Gln Gly Lys Ile
200 205 210
Thr Val Leu Asp Leu Ile Ser Cys Arg Glu Gly Lys Asp Ser Phe
215 220 225
Lys Arg Ile Phe Ser Lys Glu Ile Ile Val Tyr Asp Glu Asn Thr
230 235 240
Asn Glu Pro Ser Arg Val Met Pro Ser Gln Pro Leu His Ile Val
245 250 255
Leu Glu Ser Leu Lys Arg Glu Gly Lys Glu Pro Leu Val Leu Lys
260 265 270
Gly Gly Leu Ser Ser Phe Lys Gln Asn His Glu Asn Leu Cys Asp
275 280 285
Asn Ser Leu Gln Leu Gln Glu Cys Arg Glu Val Gly Gly Gly Ala
290 295 300
Ser Ala Ala Ser Ser Leu Leu Pro Gln Pro Ile Pro Thr Thr Pro
305 310 315
Asp Ile Glu Asn Ala Glu Leu Thr Pro Ile Leu Pro Phe Leu Phe
320 325 330
Leu Gly Asn Glu Gln Asp Ala Gln Asp Leu Asp Thr Met Gln Arg
335 340 345
Leu Asn Ile Gly Tyr Val Ile Asn Val Thr Thr His Leu Pro Leu
350 355 360
Tyr His Tyr Glu Lys Gly Leu Phe Asn Tyr Lys Arg Leu Pro Ala
365 370 375
Thr Asp Ser Asn Lys Gln Asn Leu Arg Gln Tyr Phe Glu Glu Ala
380 385 390
Phe Glu Phe Ile Glu Glu Ala His Gln Cys Gly Lys Gly Leu Leu
395 400 405
Ile His Cys Gln Ala Gly Val Ser Arg Ser Ala Thr Ile Val Ile
410 415 420
Ala Tyr Leu Met Lys His Thr Arg Met Thr Met Thr Asp Ala Tyr
425 430 435
Lys Phe Val Lys Gly Lys Arg Pro Ile Ile Ser Pro Asn Leu Asn
440 445 450
Phe Met Gly Gln Leu Leu Glu Phe Glu Glu Asp Leu Asn Asn Gly
455 460 465
Val Thr Pro Arg Ile Leu Thr Pro Lys Leu Met Gly Val Glu Thr
470 475 480
Val Val

```

<210> 2
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 563663CD1

```

<400> 2
Met Ser Arg Arg Arg Phe Asp Cys Arg Ser Ile Ser Gly Leu Leu
1 5 10 15
Thr Thr Thr Pro Gln Ile Pro Ile Lys Met Glu Asn Phe Asn Asn
20 25 30
Phe Tyr Ile Leu Thr Ser Lys Glu Leu Gly Arg Gly Lys Phe Ala
35 40 45
Val Val Arg Gln Cys Ile Ser Lys Ser Thr Gly Gln Glu Tyr Ala
50 55 60

```

Ala	Lys	Phe	Leu	Lys	Lys	Arg	Arg	Arg	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Ala	
				65					70					75	
Glu	Ile	Leu	His	Glu	Ile	Ala	Val	Leu	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Cys	
				80					85					90	
Pro	Arg	Val	Ile	Asn	Leu	His	Glu	Val	Tyr	Glu	Asn	Thr	Ser	Glu	
				95					100					105	
Ile	Ile	Leu	Ile	Leu	Glu	Tyr	Ala	Ala	Gly	Gly	Glu	Ile	Phe	Ser	
				110					115					120	
Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Leu	Ala	Glu	Met	Val	Ser	Glu	Asn	Asp	Val	
				125					130					135	
Ile	Arg	Leu	Ile	Lys	Gln	Ile	Leu	Glu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Leu	His	
				140					145					150	
Gln	Asn	Asn	Ile	Val	His	Leu	Asp	Leu	Lys	Pro	Gln	Asn	Ile	Leu	
				155					160					165	
Leu	Ser	Ser	Ile	Tyr	Pro	Leu	Gly	Asp	Ile	Lys	Ile	Val	Asp	Gly	
				170					175					180	
Gly	Met	Ser	Arg	Lys	Ile	Gly	Gln	Cys	Val						
				185					190						

<210> 3

<211> 455

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 1425842CD1

<400> 3

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

	230		235		240
Gln Cys Trp Glu Ala Asp Ala Lys Lys Arg Pro Ser Phe Lys Gln					
	245		250		255
Ile Ile Ser Ile Leu Glu Ser Met Ser Asn Asp Thr Ser Leu Pro					
	260		265		270
Asp Lys Cys Asn Ser Phe Leu His Asn Lys Ala Glu Trp Arg Cys					
	275		280		285
Glu Ile Glu Ala Thr Leu Glu Arg Leu Lys Lys Leu Glu Arg Asp					
	290		295		300
Leu Ser Phe Lys Glu Gln Glu Leu Lys Glu Arg Glu Arg Arg Leu					
	305		310		315
Lys Met Trp Glu Gln Lys Leu Thr Glu Gln Ser Asn Thr Pro Leu					
	320		325		330
Leu Leu Pro Leu Ala Ala Arg Met Ser Glu Glu Ser Tyr Phe Glu					
	335		340		345
Ser Lys Thr Glu Glu Ser Asn Ser Ala Glu Met Ser Cys Gln Ile					
	350		355		360
Thr Ala Thr Ser Asn Gly Glu Gly His Gly Met Asn Pro Ser Leu					
	365		370		375
Gln Ala Met Met Leu Met Gly Phe Gly Asp Ile Phe Ser Met Asn					
	380		385		390
Lys Ala Gly Ala Val Met His Ser Gly Met Gln Ile Asn Met Gln					
	395		400		405
Ala Lys Gln Asn Ser Ser Lys Thr Thr Ser Lys Arg Arg Gly Lys					
	410		415		420
Lys Val Asn Met Ala Leu Gly Phe Ser Asp Phe Asp Leu Ser Glu					
	425		430		435
Gly Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gly Glu Glu Glu Asp Asn Asp					
	440		445		450
Met Asp Asn Ser Glu					
	455				

<210> 4
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2349047CD1

<400> 4	
Met Ala Lys Gly Gly Ile Phe Pro Arg Pro Arg Cys Asp Ser Ser	
1 5 10 15	
Ser Leu Leu Glu Cys Arg Lys Ala Ile Ser Arg Glu Val Lys Ala	
20 25 30	
Met Ala Ser Leu Asp Asn Glu Phe Val Leu Arg Leu Glu Gly Val	
35 40 45	
Ile Glu Lys Val Asn Trp Asp Gln Asp Pro Lys Pro Ala Leu Val	
50 55 60	
Thr Lys Phe Met Glu Asn Gly Ser Leu Ser Gly Leu Leu Gln Ser	
65 70 75	
Gln Cys Pro Arg Pro Trp Pro Leu Leu Cys Arg Leu Leu Lys Glu	
80 85 90	
Val Val Leu Gly Met Phe Tyr Leu His Asp Gln Asn Pro Val Leu	
95 100 105	
Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Val Leu Leu Asp Pro Glu	
110 115 120	
Leu His Val Lys Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ser Thr Phe Gln Gly	
125 130 135	

Gly	Ser	Gln	Ser	Gly	Thr	Gly	Ser	Gly	Glu	Pro	Gly	Gly	Thr	Leu
				140					145					150
Gly	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Leu	Phe	Val	Asn	Val	Asn	Arg	Lys	Ala
				155					160					165
Ser	Thr	Ala	Ser	Asp	Val	Tyr	Ser	Phe	Gly	Ile	Leu	Met	Trp	Ala
				170					175					180
Val	Leu	Ala	Gly	Arg	Glu	Val	Glu	Leu	Pro	Thr	Glu	Pro	Ser	Leu
				185					190					195
Val	Tyr	Glu	Ala	Val	Cys	Asn	Arg	Gln	Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Ala
				200					205					210
Glu	Leu	Pro	Gln	Ala	Gly	Pro	Glu	Thr	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu
				215					220					225
Lys	Glu	Leu	Met	Gln	Leu	Cys	Trp	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Asp	Arg
				230					235					240
Pro	Ser	Phe	Gln	Glu	Cys	Leu	Pro	Lys	Thr	Asp	Glu	Val	Phe	Gln
				245					250					255
Met	Val	Glu	Asn	Asn	Met	Asn	Ala	Ala	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Asp
				260					265					270
Phe	Leu	Ser	Gln	Leu	Arg	Ser	Ser	Asn	Arg	Arg	Phe	Ser	Ile	Pro
				275					280					285
Glu	Ser	Gly	Gln	Gly	Gly	Thr	Glu	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Arg	Thr
				290					295					300
Ile	Glu	Asn	Gln	His	Ser	Arg	Asn	Asp	Val	Met	Val	Ser	Glu	Trp
				305					310					315
Leu	Asn	Lys	Leu	Asn	Leu	Glu	Glu	Pro	Pro	Ser	Ser	Val	Pro	Lys
				320					325					330
Lys	Cys	Pro	Ser	Leu	Thr	Lys	Arg	Ser	Arg	Ala	Gln	Glu	Glu	Gln
				335					340					345
Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Thr	Ala	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Ser	Met	Ala
				350					355					360
Gln	Pro	Pro	Gln	Thr	Pro	Glu	Thr	Ser	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Met
				365					370					375
Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Gly	Thr	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	Arg	Gly
				380					385					390
Asn	Gln	Gly	Ala	Glu	Arg	Gln	Gly	Met	Asn	Trp	Ser	Cys	Arg	Thr
				395					400					405
Pro	Glu	Pro	Asn	Pro	Val	Thr	Gly	Arg	Pro	Leu	Val	Asn	Ile	Tyr
				410					415					420
Asn	Cys	Ser	Gly	Val	Gln	Val	Gly	Asp	Asn	Asn	Tyr	Leu	Thr	Met
				425					430					435
Gln	Gln	Thr	Thr	Ala	Leu	Pro	Thr	Trp	Gly	Leu	Ala	Pro	Ser	Gly
				440					445					450
Lys	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	His	Pro	Pro	Pro	Val	Gly	Ser	Gln	Glu
				455					460					465
Gly	Pro	Lys	Asp	Pro	Glu	Ala	Trp	Ser	Arg	Pro	Gln	Gly	Trp	Tyr
				470					475					480
Asn	His	Ser	Gly	Lys										
				485										

<210> 5

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2415617CD1

<400> 5

Met Asp Pro Ala Gly Gly Pro Arg Gly Val Leu Pro Arg Pro Cys

1	5	10	15
Arg Val Leu Val Leu Leu Asn Pro Arg Gly Gly Lys Gly Lys Ala			
	20	25	30
Leu Gln Leu Phe Arg Ser His Val Gln Pro Leu Leu Ala Glu Ala			
	35	40	45
Glu Ile Ser Phe Thr Leu Met Leu Thr Glu Arg Arg Asn His Ala			
	50	55	60
Arg Glu Leu Val Arg Ser Glu Glu Leu Gly Arg Trp Asp Ala Leu			
	65	70	75
Val Val Met Ser Gly Asp Gly Leu Met His Glu Val Val Asn Gly			
	80	85	90
Leu Met Glu Arg Pro Asp Trp Glu Thr Ala Ile Gln Lys Pro Leu			
	95	100	105
Cys Ser Leu Pro Ala Gly Ser Gly Asn Ala Leu Ala Ala Ser Leu			
	110	115	120
Asn His Tyr Ala Gly Tyr Glu Gln Val Thr Asn Glu Asp Leu Leu			
	125	130	135
Thr Asn Cys Thr Leu Leu Leu Cys Arg Arg Leu Leu Ser Pro Met			
	140	145	150
Asn Leu Leu Ser Leu His Thr Ala Ser Gly Leu Arg Leu Phe Ser			
	155	160	165
Val Leu Ser Leu Ala Trp Gly Phe Ile Ala Asp Val Asp Leu Glu			
	170	175	180
Ser Glu Lys Tyr Arg Arg Leu Gly Glu Met Arg Phe Thr Leu Gly			
	185	190	195
Thr Phe Leu Arg Leu Ala Ala Leu Arg Thr Tyr Arg Gly Arg Leu			
	200	205	210
Ala Tyr Leu Pro Val Gly Arg Val Gly Ser Lys Thr Pro Ala Ser			
	215	220	225
Pro Val Val Val Gln Gln Gly Pro Val Asp Ala His Leu Val Pro			
	230	235	240
Leu Glu Glu Pro Val Pro Ser His Trp Thr Val Val Pro Asp Glu			
	245	250	255
Asp Phe Val Leu Val Leu Ala Leu Leu His Ser His Leu Gly Ser			
	260	265	270
Glu Met Phe Ala Ala Pro Met Gly Arg Cys Ala Ala Gly Val Met			
	275	280	285
His Leu Phe Tyr Val Arg Ala Gly Val Ser Arg Ala Met Leu Leu			
	290	295	300
Arg Leu Phe Leu Ala Met Glu Lys Gly Arg His Met Glu Tyr Glu			
	305	310	315
Cys Pro Tyr Leu Val Tyr Val Pro Val Val Ala Phe Arg Leu Glu			
	320	325	330
Pro Lys Asp Gly Lys Gly Val Phe Ala Val Asp Gly Glu Leu Met			
	335	340	345
Val Ser Glu Ala Val Gln Gly Gln Val His Pro Asn Tyr Phe Trp			
	350	355	360
Met Val Ser Gly Cys Val Glu Pro Pro Pro Ser Trp Lys Pro Gln			
	365	370	375
Gln Met Pro Pro Pro Glu Glu Pro Leu			
	380		

<210> 6

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 3815186CD1

<400> 6

```

Met Arg Trp Tyr Gln Pro Pro Asn Asp Trp Arg Ile Leu Val Leu
 1      5      10      15
Cys Leu Ser Ser Tyr Ala Val Leu Met Cys Leu Leu Ser Ile Trp
      20      25      30
Gln Arg Asp Lys Arg Asp Thr Ser Asn Phe Asp Lys Glu Phe Thr
      35      40      45
Arg Gln Pro Val Glu Leu Thr Pro Thr Asp Lys Leu Phe Ile Met
      50      55      60
Asn Leu Asp Gln Asn Glu Phe Ala Gly Phe Ser Tyr Thr Asn Pro
      65      70      75
Glu Phe Val Ile Asn Val
      80

```

<210> 7

<211> 721

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 5504544CD1

<400> 7

```

Met Leu Phe Gly Leu Val Arg Gln Gly Leu Lys Cys Asp Gly Cys
 1      5      10      15
Gly Leu Asn Tyr His Lys Arg Cys Ala Phe Ser Ile Pro Asn Asn
      20      25      30
Cys Ser Gly Ala Arg Lys Arg Arg Leu Ser Ser Thr Ser Leu Ala
      35      40      45
Ser Gly His Ser Val Arg Leu Gly Thr Ser Glu Ser Leu Pro Cys
      50      55      60
Thr Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Thr Thr Glu Leu Leu Pro Arg
      65      70      75
Arg Pro Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Tyr Thr
      80      85      90
Gly Arg Pro Ile Glu Leu Asp Lys Met Leu Leu Ser Lys Val Lys
      95      100      105
Val Pro His Thr Phe Leu Ile His Ser Tyr Thr Arg Pro Thr Val
      110      115      120
Cys Gln Ala Cys Lys Lys Leu Leu Lys Gly Leu Phe Arg Gln Gly
      125      130      135
Leu Gln Cys Lys Asp Cys Lys Phe Asn Cys His Lys Arg Cys Ala
      140      145      150
Thr Arg Val Pro Asn Asp Cys Leu Gly Glu Ala Leu Ile Asn Gly
      155      160      165
Asp Val Pro Met Glu Glu Ala Thr Asp Phe Ser Glu Ala Asp Lys
      170      175      180
Ser Ala Leu Met Asp Glu Ser Glu Asp Ser Gly Val Ile Pro Gly
      185      190      195
Ser His Ser Glu Asn Ala Leu His Ala Ser Glu Glu Glu Glu Gly
      200      205      210
Glu Gly Gly Lys Ala Gln Ser Ser Leu Gly Tyr Ile Pro Leu Met
      215      220      225
Arg Val Val Gln Ser Val Arg His Thr Thr Arg Lys Ser Ser Thr
      230      235      240
Thr Leu Arg Glu Gly Trp Val Val His Tyr Ser Asn Lys Asp Thr
      245      250      255
Leu Arg Lys Arg His Tyr Trp Arg Leu Asp Cys Lys Cys Ile Thr
      260      265      270

```

Leu	Phe	Gln	Asn	Asn	Thr	Thr	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Pro
				275					280					285
Leu	Ser	Glu	Ile	Leu	Thr	Val	Glu	Ser	Ala	Gln	Asn	Phe	Ser	Leu
				290					295					300
Val	Pro	Pro	Gly	Thr	Asn	Pro	His	Cys	Phe	Glu	Ile	Val	Thr	Ala
				305					310					315
Asn	Ala	Thr	Tyr	Phe	Val	Gly	Glu	Met	Pro	Gly	Gly	Thr	Pro	Gly
				320					325					330
Gly	Pro	Ser	Gly	Gln	Gly	Ala	Glu	Ala	Ala	Arg	Gly	Trp	Glu	Thr
				335					340					345
Ala	Ile	Arg	Gln	Ala	Leu	Met	Pro	Val	Ile	Leu	Gln	Asp	Ala	Pro
				350					355					360
Ser	Ala	Pro	Gly	His	Ala	Pro	His	Arg	Gln	Ala	Ser	Leu	Ser	Ile
				365					370					375
Ser	Val	Ser	Asn	Ser	Gln	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Asp	Ile	Ala	Thr
				380					385					390
Val	Tyr	Gln	Ile	Phe	Pro	Asp	Glu	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Gln	Phe
				395					400					405
Gly	Val	Val	Tyr	Gly	Gly	Lys	His	Arg	Lys	Thr	Gly	Arg	Asp	Val
				410					415					420
Ala	Val	Lys	Val	Ile	Asp	Lys	Leu	Arg	Phe	Pro	Thr	Lys	Gln	Glu
				425					430					435
Ser	Gln	Leu	Arg	Asn	Glu	Val	Ala	Ile	Leu	Gln	Ser	Leu	Arg	His
				440					445					450
Pro	Gly	Ile	Val	Asn	Leu	Glu	Cys	Met	Phe	Glu	Thr	Pro	Glu	Lys
				455					460					465
Val	Phe	Val	Val	Met	Glu	Lys	Leu	His	Gly	Asp	Met	Leu	Glu	Met
				470					475					480
Ile	Leu	Ser	Ser	Glu	Lys	Gly	Arg	Leu	Pro	Glu	Arg	Leu	Thr	Lys
				485					490					495
Phe	Leu	Ile	Thr	Gln	Ile	Leu	Val	Ala	Leu	Arg	His	Leu	His	Phe
				500					505					510
Lys	Asn	Ile	Val	His	Cys	Asp	Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	Val	Leu	Leu
				515					520					525
Ala	Ser	Ala	Asp	Pro	Phe	Pro	Gln	Val	Lys	Leu	Cys	Asp	Phe	Gly
				530					535					540
Phe	Ala	Arg	Ile	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Phe	Arg	Arg	Ser	Val	Val
				545					550					555
Gly	Thr	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	Leu	Leu	Asn	Gln	Gly
				560					565					570
Tyr	Asn	Arg	Ser	Leu	Asp	Met	Trp	Ser	Val	Gly	Val	Ile	Met	Tyr
				575					580					585
Val	Ser	Leu	Ser	Gly	Thr	Phe	Pro	Phe	Asn	Glu	Asp	Glu	Asp	Ile
				590					595					600
Asn	Asp	Gln	Ile	Gln	Asn	Ala	Ala	Phe	Met	Tyr	Pro	Ala	Ser	Pro
				605					610					615
Trp	Ser	His	Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	Ile	Asp	Leu	Ile	Asn	Asn	Leu

<210> 8
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1511326CD1

<400> 8
 Met Ala Ser Ser Asp Glu Asp Gly Thr Asn Gly Gly Ala Ser Glu
 1 5 10 15
 Ala Gly Glu Asp Arg Glu Ala Pro Gly Gln Arg Arg Arg Leu Gly
 20 25 30
 Phe Leu Ala Thr Ala Trp Leu Thr Phe Tyr Asp Ile Ala Met Thr
 35 40 45
 Ala Gly Trp Leu Val Leu Ala Ile Ala Met Val Arg Phe Tyr Met
 50 55 60
 Glu Lys Gly Thr His Arg Gly Leu Tyr Lys Ser Ile Gln Lys Thr
 65 70 75
 Leu Lys Phe Phe Gln Thr Phe Ala Leu Leu Glu Ile Val His Cys
 80 85 90
 Leu Ile Gly Ile Val Pro Thr Ser Val Ile Val Thr Gly Val Gln
 95 100 105
 Val Ser Ser Arg Ile Phe Met Val Trp Leu Ile Thr His Ser Ile
 110 115 120
 Lys Pro Ile Gln Asn Glu Glu Ser Val Val Leu Phe Leu Val Ala
 125 130 135
 Trp Thr Val Thr Glu Ile Thr Arg Tyr Ser Phe Tyr Thr Phe Ser
 140 145 150
 Leu Leu Asp His Leu Pro Tyr Phe Ile Lys Trp Ala Arg Tyr Asn
 155 160 165
 Phe Phe Ile Ile Leu Tyr Pro Val Gly Val Ala Gly Glu Leu Leu
 170 175 180
 Thr Ile Tyr Ala Ala Leu Pro His Val Lys Lys Thr Gly Met Phe
 185 190 195
 Ser Ile Arg Leu Pro Asn Lys Tyr Asn Val Ser Phe Asp Tyr Tyr
 200 205 210
 Tyr Phe Leu Leu Ile Thr Met Ala Ser Tyr Ile Pro Leu Phe Pro
 215 220 225
 Gln Leu Tyr Phe His Met Leu Arg Gln Arg Arg Lys Val Leu His
 230 235 240
 Gly Glu Val Ile Val Glu Lys Asp Asp
 245

<210> 9
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1519120CD1

<400> 9
 Met Ala Asp Asp Asp Val Leu Phe Glu Asp Val Tyr Glu Leu Cys
 1 5 10 15
 Glu Val Ile Gly Lys Gly Pro Phe Ser Val Val Arg Arg Cys Ile
 20 25 30

```

Asn Arg Glu Thr Gly Gln Gln Phe Ala Val Lys Ile Val Asp Val
      35              40              45
Ala Lys Phe Thr Ser Ser Pro Gly Leu Ser Thr Glu Gly Lys Arg
      50              55              60
Trp Ile Ser Asn Leu Lys Arg Glu Ala Ser Ile Cys His Met Leu
      65              70              75
Lys His Pro His Ile Val Glu Leu Leu Glu Thr Tyr Ser Ser Asp
      80              85              90
Gly Met Leu Tyr Met Val Phe Glu Phe Met Asp Gly Ala Asp Leu
      95              100             105
Cys Phe Glu Ile Val Lys Arg Ala Asp Ala Gly Phe Val Tyr Ser
      110             115             120
Glu Ala Val Ala Ser Ile Leu Asp Lys His Ser Trp Lys Gln Leu
      125             130             135
Gly Asp His Leu Asn Thr Ala Leu Ser Ser Ala
      140             145

```

```

<210> 10
<211> 524
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1673761CD1

```

```

<400> 10
Met Asn Ile Ala Asn Arg Lys Gln Glu Glu Met Lys Asp Met Ile
  1      5      10
Val Glu Thr Leu Asn Thr Met Lys Glu Glu Leu Leu Asp Asp Ala
  20      25      30
Thr Asn Met Glu Phe Lys Asp Val Ile Val Pro Glu Asn Gly Glu
  35      40      45
Pro Val Gly Thr Arg Glu Ile Lys Cys Cys Ile Arg Gln Ile Gln
  50      55      60
Glu Leu Ile Ile Ser Arg Leu Asn Gln Ala Val Ala Asn Lys Leu
  65      70      75
Ile Ser Ser Val Asp Tyr Leu Arg Glu Ser Phe Val Gly Thr Leu
  80      85      90
Glu Arg Cys Leu Gln Ser Leu Glu Lys Ser Gln Asp Val Ser Val
  95      100     105
His Ile Thr Ser Asn Tyr Leu Lys Gln Ile Leu Asn Ala Ala Tyr
  110     115     120
His Val Glu Val Thr Phe His Ser Gly Ser Ser Val Thr Arg Met
  125     130     135
Leu Trp Glu Gln Ile Lys Gln Ile Ile Gln Arg Ile Thr Trp Val
  140     145     150
Ser Pro Pro Ala Ile Thr Leu Glu Trp Lys Arg Lys Val Ala Gln
  155     160     165
Glu Ala Ile Glu Ser Leu Ser Ala Ser Lys Leu Ala Lys Ser Ile
  170     175     180
Cys Ser Gln Phe Arg Thr Arg Leu Asn Ser Ser His Glu Ala Phe
  185     190     195
Ala Ala Ser Leu Arg Gln Leu Glu Ala Gly His Ser Gly Arg Leu
  200     205     210
Glu Lys Thr Glu Asp Leu Trp Leu Arg Val Arg Lys Asp His Ala
  215     220     225
Pro Arg Leu Ala Arg Leu Ser Leu Glu Ser Cys Ser Leu Gln Asp
  230     235     240
Val Leu Leu His Arg Lys Pro Lys Leu Gly Gln Glu Leu Gly Arg

```

	245		250		255									
Gly	Gln	Tyr	Gly	Val	Val	Tyr	Leu	Cys	Asp	Asn	Trp	Gly	Gly	His
	260		265		270									
Phe	Pro	Cys	Ala	Leu	Lys	Ser	Val	Val	Pro	Pro	Asp	Glu	Lys	His
	275		280		285									
Trp	Asn	Asp	Leu	Ala	Leu	Glu	Phe	His	Tyr	Met	Arg	Ser	Leu	Pro
	290		295		300									
Lys	His	Glu	Arg	Leu	Val	Asp	Leu	His	Gly	Ser	Val	Ile	Asp	Tyr
	305		310		315									
Asn	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Ile	Ala	Val	Leu	Leu	Ile	Met	Glu
	320		325		330									
Arg	Leu	His	Arg	Asp	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Leu	Thr
	335		340		345									
Leu	Glu	Thr	Arg	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Gly	Ile
	350		355		360									
Arg	Phe	Leu	His	Ser	Gln	Gly	Leu	Val	His	Arg	Asp	Ile	Lys	Leu
	365		370		375									
Lys	Asn	Val	Leu	Leu	Asp	Lys	Gln	Asn	Arg	Ala	Lys	Ile	Thr	Asp
	380		385		390									
Leu	Gly	Phe	Cys	Lys	Pro	Glu	Ala	Met	Met	Ser	Gly	Ser	Ile	Val
	395		400		405									
Gly	Thr	Pro	Ile	His	Met	Ala	Pro	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Lys	Tyr
	410		415		420									
Asp	Asn	Ser	Val	Asp	Val	Tyr	Ala	Phe	Gly	Ile	Leu	Phe	Trp	Tyr
	425		430		435									
Ile	Cys	Ser	Gly	Ser	Val	Lys	Leu	Pro	Glu	Ala	Phe	Glu	Arg	Cys
	440		445		450									
Ala	Ser	Lys	Asp	His	Leu	Trp	Asn	Asn	Val	Arg	Arg	Gly	Ala	Arg
	455		460		465									
Pro	Glu	Arg	Leu	Pro	Val	Phe	Asp	Glu	Glu	Cys	Trp	Gln	Leu	Met
	470		475		480									
Glu	Ala	Cys	Trp	Asp	Gly	Asp	Pro	Leu	Lys	Arg	Pro	Leu	Leu	Gly
	485		490		495									
Ile	Val	Gln	Pro	Met	Leu	Gln	Gly	Ile	Met	Asn	Arg	Leu	Cys	Lys
	500		505		510									
Ser	Asn	Ser	Glu	Gln	Pro	Asn	Arg	Gly	Leu	Asp	Asp	Ser	Thr	
	515		520											

<210> 11

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 1270442CD1

<400> 11

Met	Arg	Leu	Arg	Glu	Arg	Ser	Leu	Arg	Gln	Asp	Pro	Asp	Leu	Arg
1				5					10					15
Gln	Glu	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Arg	Gly	Cys	Asp	Phe	Val	Leu	Pro
				20					25					30
Ser	Arg	Phe	Lys	Lys	Arg	Leu	Lys	Ala	Phe	Gln	Gln	Val	Gln	Thr
				35					40					45
Arg	Lys	Glu	Glu	Pro	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr	Ser	Gln	Ser	Ile	Pro
				50					55					60
Thr	Phe	Tyr	Phe	Pro	Arg	Gly	Arg	Pro	Gln	Asp	Ser	Val	Asn	Val
				65					70					75
Asp	Ala	Val	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu	Ser	Thr	Phe	Ala	Arg	Phe	Pro
				80					85					90

His	Glu	Arg	Ala	Thr	Met	Asp	Asp	Met	Gly	Leu	Val	Ala	Lys	Ala
				95					100					105
Cys	Gly	Cys	Pro	Leu	Tyr	Trp	Lys	Gly	Pro	Leu	Phe	Tyr	Gly	Ala
				110					115					120
Gly	Gly	Glu	Arg	Thr	Gly	Ser	Val	Ser	Val	His	Lys	Phe	Val	Ala
				125					130					135
Met	Trp	Arg	Lys	Ile	Leu	Gln	Asn	Cys	His	Asp	Asp	Ala	Ala	Lys
				140					145					150
Phe	Val	His	Leu	Leu	Met	Ser	Pro	Gly	Cys	Asn	Tyr	Leu	Val	Gln
				155					160					165
Glu	Asp	Phe	Val	Pro	Phe	Leu	Gln	Asp	Val	Val	Asn	Thr	His	Pro
				170					175					180
Gly	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys	Glu	Ala	Ser	Glu	Phe	His	Ser	Arg	Tyr
				185					190					195
Ile	Thr	Thr	Val	Ile	Gln	Arg	Ile	Phe	Tyr	Ala	Val	Asn	Arg	Ser
				200					205					210
Trp	Ser	Gly	Arg	Ile	Thr	Cys	Ala	Glu	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser	Phe
				215					220					225
Leu	Gln	Asn	Val	Ala	Leu	Leu	Glu	Glu	Glu	Ala	Asp	Ile	Asn	Gln
				230					235					240
Leu	Thr	Glu	Phe	Phe	Ser	Tyr	Glu	His	Phe	Tyr	Val	Ile	Tyr	Cys
				245					250					255
Lys	Phe	Trp	Glu	Leu	Asp	Thr	Asp	His	Asp	Leu	Leu	Ile	Asp	Ala
				260					265					270
Asp	Asp	Leu	Ala	Arg	His	Asn	Asp	His	Ala	Leu	Ser	Thr	Lys	Met
				275					280					285
Ile	Asp	Arg	Ile	Phe	Ser	Gly	Ala	Val	Thr	Arg	Gly	Arg	Lys	Val
				290					295					300
Gln	Lys	Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	Tyr	Ala	Asp	Phe	Val	Trp	Phe	Leu
				305					310					315
Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Lys	Lys	Thr	Pro	Thr	Ser	Ile	Glu	Tyr	Trp
				320					325					330
Phe	Arg	Cys	Met	Asp	Leu	Asp	Gly	Asp	Gly	Ala	Leu	Ser	Met	Phe
				335					340					345
Glu	Leu	Glu	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Glu	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Asp	Ser
				350					355					360
Met	Ala	Ile	Glu	Ala	Leu	Pro	Phe	Gln	Asp	Cys	Leu	Cys	Gln	Met
				365					370					375
Leu	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Arg	Thr	Glu	Gly	Lys	Ile	Thr	Leu	Gln
				380					385					390
Asp	Leu	Lys	Arg	Cys	Lys	Leu	Ala	Asn	Val	Phe	Phe	Asp	Thr	Phe
				395					400					405
Phe	Asn	Ile	Glu	Lys	Tyr	Leu	Asp	His	Glu	Gln	Lys	Glu	Gln	Ile
				410					415					420
Ser	Leu	Leu	Arg	Asp	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Asp
				425					430					435
Trp	Glu	Lys	Tyr	Ala	Ala	Glu	Glu	Tyr	Asp	Ile	Leu	Val	Ala	Glu
				440					445					450
Glu	Thr	Ala	Gly	Glu	Pro	Trp	Glu	Asp	Gly	Phe	Glu	Ala	Glu	Leu
				455					460					465
Ser	Pro	Val	Glu	Gln	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala
				470					475					480
Gln	Arg	Pro	Phe	Phe	Glu	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Asp
				485					490					495
Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Cys	Gly	Asp	Glu	Asp	Leu	Glu	Pro	Leu	
				500					505					

<210> 12

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 1877133CD1

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2636759CD1

<400> 13

```

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

```

```

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

```

```

<210> 14
<211> 462
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2716815CD1

```

```

<400> 14
Met Ser Ile Ala Gly Val Ala Ala Gln Glu Ile Arg Val Pro Leu
  1      5      10
Lys Thr Gly Phe Leu His Asn Gly Arg Ala Met Gly Asn Met Arg
  20      25      30
Lys Thr Tyr Trp Ser Ser Arg Ser Glu Phe Lys Asn Asn Phe Leu
  35      40      45
Asn Ile Asp Pro Ile Thr Met Ala Tyr Ser Leu Asn Ser Ser Ala
  50      55      60
Gln Glu Arg Leu Ile Pro Leu Gly His Ala Ser Lys Ser Ala Pro
  65      70      75
Met Asn Gly His Cys Phe Ala Glu Asn Gly Pro Ser Gln Lys Ser
  80      85      90
Ser Leu Pro Pro Leu Leu Ile Pro Pro Ser Glu Asn Leu Gly Pro
  95     100     105
His Glu Glu Asp Gln Val Val Cys Gly Phe Lys Lys Leu Thr Val
 110     115     120
Asn Gly Val Cys Ala Ser Thr Pro Pro Leu Thr Pro Ile Lys Asn
 125     130     135
Ser Pro Ser Leu Phe Pro Cys Ala Pro Leu Cys Glu Arg Gly Ser
 140     145     150
Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Ile Ser Glu Ala Leu Ser Leu Asp
 155     160     165
Asp Thr Asp Cys Glu Val Glu Phe Leu Thr Ser Ser Asp Thr Asp
 170     175     180
Phe Leu Leu Glu Asp Ser Thr Leu Ser Asp Phe Lys Tyr Asp Val
 185     190     195
Pro Gly Arg Arg Ser Phe Arg Gly Cys Gly Gln Ile Asn Tyr Ala
 200     205     210
Tyr Phe Asp Thr Pro Ala Val Ser Ala Ala Asp Leu Ser Tyr Val
 215     220     225
Ser Asp Gln Asn Gly Gly Val Pro Asp Pro Asn Pro Pro Pro Pro
 230     235     240
Gln Thr His Arg Arg Leu Arg Arg Ser His Ser Gly Pro Ala Gly
 245     250     255
Ser Phe Asn Lys Pro Ala Ile Arg Ile Ser Asn Cys Cys Ile His
 260     265     270
Arg Ala Ser Pro Asn Ser Asp Glu Asp Lys Pro Glu Val Pro Pro
 275     280     285
Arg Val Pro Ile Pro Pro Arg Pro Val Lys Pro Asp Tyr Arg Arg
 290     295     300
Trp Ser Ala Glu Val Thr Ser Ser Thr Tyr Ser Asp Glu Asp Arg

```

				305					310				315	
Pro	Pro	Lys	Val	Pro	Pro	Arg	Glu	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Asn	Ser
				320					325				330	
Arg	Thr	Pro	Ser	Pro	Lys	Ser	Leu	Pro	Ser	Tyr	Leu	Asn	Gly	Val
				335					340				345	
Met	Pro	Pro	Thr	Gln	Ser	Phe	Ala	Pro	Asp	Pro	Lys	Tyr	Val	Ser
				350					355				360	
Ser	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Ser	Lys
				365					370				375	
Val	Pro	Cys	Ile	Leu	Pro	Ile	Ile	Glu	Asn	Gly	Lys	Lys	Val	Ser
				380					385				390	
Ser	Thr	His	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Pro	Glu	Arg	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp
				395					400				405	
Lys	Tyr	Glu	Lys	Phe	Phe	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu	Thr	Asn	Gly	Gly
				410					415				420	
Ala	Gln	Ile	Gln	Pro	Leu	Pro	Ala	Asp	Cys	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala
				425					430				435	
Thr	Glu	Lys	Pro	Asp	Ser	Lys	Thr	Lys	Met	Asp	Leu	Gly	Gly	His
				440					445				450	
Val	Lys	Arg	Lys	His	Leu	Ser	Tyr	Val	Val	Ser	Pro			
				455					460					

<210> 15

<211> 2192

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 480457CB1

<400> 15

```

gatcaatgaa gccgagtgaa tgggggctga atgtgcgagt ccatagctga agaggagcgc 60
cagatgggtgg aggaatacac ttatttatga aactgtcttg agttcttctt gaattgccag 120
tttcoagcct cctcatgcct ccgtctcctt tagacgacag ggtagtagtg gcactatcta 180
ggcccgctcg acctcaggat ctcaaccttt gtttagactc tagttacctt ggctctgccca 240
accagggcag taacagccac cctcctgtca tcgccaccac cgttgtgtcc ctcaaggctg 300
cgaatctgac gtatatgccc tcatccagcg gctctgcccg ctctgtgaat tgtggatgca 360
gcagtgccag ctgctgcact gtggcaacct acgacaagga caatcaggcc caaacccaag 420
ccattgccgc tggcaccacc accactgccca tcggaacctc taccacctgc cctgctaacc 480
agatgggtcaa caataatgag aatacaggct ctctaagtc atcaagtggg gtgggcagcc 540
ctgtgtcagg gacccccaag cagctagcca gcatcaaaat aatctacccc aatgacttgg 600
caaagaagat gaccaaagtc agcaagagtc acctgccgag tcagggccct gtcattattg 660
actgcaggcc ctctatggag tacaacaaga gtcacatcca aggagctgtc cacattaact 720
gtgccgataa gatcagccgg cgggagactgc agcagggcaa gatcactgtc ctgacttga 780
tttctgttag ggaaggcaag gactctttca agaggatctt ttccaaagaa attatagttt 840
atgatgagaa taccatgag ccaagccgag tgatgccctc ccagccactt cacatagtc 900
tcgagtcctt gaagagagaa ggcaaagaac ctctggtgtt gaaagtgga cttagtagtt 960
ttaagcagaa ccatgaaaac ctctgtgaca actccctcca gctccaagag tgccgggagg 1020
tggggggcgg cgcatccgcy gcctcgagct tgctacctca gcccatcccc accacccctg 1080
acatcgagaa cgctgagctc accccatct tgcccttctt gttccttggc aatgagcagg 1140
atgctcagga cctggacacc atgcagcggc tgaacatcgg ctacgtcatc aacgtcacca 1200
ctcatcttcc cctctaccac tatgagaaag gcctgttcaa ctacaagcgg ctgccagcca 1260
ctgacagcaa caagcagaac ctgcggcagt actttgaaga ggcttttgag ttcattgagg 1320
aagctcacca gtgtgggaag gggcttctca tccactgccca ggctgggggtg tcccgctccg 1380
ccaccatcgt catcgcttac ttgatgaagc aactcggat gaccatgact gatgcttata 1440
aatttgtcaa aggcaaacga ccaattatct ccccaaacct taacttcatg gggcagttgc 1500
tagagttcga ggaagacctt aacaacgggt tgacaccgag aatccttaca ccaaagctga 1560
tgggcgtgga gacggttgtg tgacaatggt ctggatggaa aggattgctg ctctccatta 1620
ggagacaatg aggaaggagg atggattctg gttttttttt tttctttttt tttttgtagt 1680

```

```

tgggagtaag tttgtgaatg gaaacaaact tgtttaaaca cttttttttt aacaagtgtg 1740
agaagactat aacttttgat gccattgaga ttccacctccc acaaactgac aaattaagga 1800
gggttaaagaa gtaatttttt taagccaaca ataaaaatat aatacaactt gtttctcccc 1860
cttttctctt taagctatct gtagagttaa tgactaaata gtctgtgcag gttcatagac 1920
cgaagatact acacacttta aaccaattaa aaagaacca aagtaaatag aaaagacatt 1980
gaatcaccaa ggcctgggat caacctgggc tgtccacaca gaaaacaaaa acccaaccaa 2040
accaagccct gttgtgctca ctgggtcaaa gagaagatca gggcagctta agtgggtctaa 2100
gaatccttca ggcattcttt aaggagaaaa aggatacctt tgattttgtg tgtttcatgc 2160
tctggatttt tttttttttc cttctctggg tt                                     2192

```

```

<210> 16
<211> 1338
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> 959, 1029, 1159
<223> a or g or c or t, unknown, or other

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 563663CB1

```

```

<400> 16
ccttgtcttg aaaagtaaaa gtggatcctg ccacgttcgg agctccctgg cgccctcgccc 60
ggctggagct agagaactcg tctgtggtgg gcccccgcg tggggcgagg cagcgccccc 120
ctggaggggg cagtcccggg agaacctgag gcggccggag cggtaaaaat aagtgactaa 180
agaagcagac ctgggaatca cctaacatgt cgaggaggag atttgattgc cgaagtattt 240
caggcctact aactacaact cctcaaattc caataaaaaat ggaaaacttt aataatttct 300
atatacttac atctaaagag ctaggggagag gaaaatttgc tgtggttaga caatgtatat 360
caaaatctac tggccaagaa tatgtctgcaa aattttctaaa aaagagaaga agaggacagg 420
attgtcgggc agaaatttta cagcagattg ctgtgcttga attggcaaa gcttctcccc 480
gtgttattaa tcttcatgag gtctatgaaa atacaagtga aatcattttg atattggaat 540
atgctgcagg tggagaaatt ttcagcctgt gtttacctga gttggctgaa atgggtttctg 600
aaaatgatgt tatcagactc attaaacaaa tacttgaagg agtttattat ctacatcaga 660
ataacattgt acaccttgat ttaaagccac agaatatatt actgagcagc atataccctc 720
tcggggacat taaaatagta gatgggggaa tgtctcgaaa aatagggcaa tgcgtgtgac 780
cttcgggaaa tcatggggaac accagaatat ttagctccag aaatcctgaa ctatgatccc 840
attaccacag aaacagatat gtggaatatt ggtataatag catatatgtc gctaactcac 900
acatcccat tttgtgggaga agataatcaa gaaacatacc tcaatctctc tcaagttant 960
gtagattatt cggaagaaac tttcccatca gtttcacagc tggccacaga ctttattcag 1020
agcccttcng taacacctcc agagaaacga caccagcaga gatctgcctc cctcattctc 1080
gcctacagca gcgggacttt gcaacattgt ctacactgaa cgaacctcca gttcccccca 1140
aactcaggat caatctgtna ggtctctaa acaagactct taatccccct gcatggaact 1200
cgggtgaaga gaagtacgag atctcccgcg gttgcagact gctcaaacca ttcgtctgat 1260
atctatcccc ccccccaac tgtccaattg gttttacatc tttcttgctc aggtcttctc 1320
gacttgcttc cccctac                                     1338

```

```

<210> 17
<211> 1706
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1425842CB1

<400> 17

```

```

cgtgggagcc ggcggggccg ctgtcgtccc aacccccgcc gccctcgtcg cgcgcggggc 60
ctccgcgccc ccggtctgctg ctcacgcccc gcccgggagc cagattttgt ggaagtataa 120
tactttgtca ttatgagatg tcgtctctcg gtgcctcctt tgtgcaaatt aaatttgatg 180
acttgcagtt ttttgaanaac tgcggtggag gaagtttttg gagtgtttat cgagccaaat 240
ggatatcaca ggacaaggag gtggctgtaa agaagctcct caaaatagag aaagaggcag 300
aaatactcag tgtcctcagt cacagaaaca tcattccagtt ttatggagta attcttgaac 360
ctcccaacta tggcattgtc acagaatatg cttctctggg atcactctat gattacatta 420
acagtaacag aagtgaggag atggatatgg atcacattat gacctgggcc actgatgtag 480
ccaaaggaaat gcattattta catatggagg ctctgtcaa ggtgattcac agagacctca 540
agtcaagaaa cgttggtata gctgctgatg gagtattgaa gatctgtgac tttggtgcct 600
ctcggttcca taaccataca acacacatgt ccttgggttg aactttccca tggatggctc 660
cagaagttat ccagagtctc cctgtgtcag aaacttgtga cacatattcc tatggtgtgg 720
ttctctggga gatgctaaca agggagggtcc ctttaaaagg tttggaagga ttacaagtag 780
cttggcttgt agtggaanaa aacgagagat taaccattcc aagcagttgc cccagaagtt 840
ttgctgaact gttacatcag tgttgggaag ctgatgccaa gaaacggcca tcattcaagc 900
aatcatttcc aatcctggag tccatgtcaa atgacacgag ccttcctgac aagtgttaact 960
cattctcaca caacaaggcg gagtgagggt gcgaaattga ggcaactctt gagaggctaa 1020
agaaactaga gcgtgatctc agctttaagg agcaggagct taaagaacga gaaagacgtt 1080
taaagatgtg ggagcaaaag ctgacagagc agtccaacac ccgctctctc ttgctctctg 1140
ctgcaagaat gtcctgaggag tcttactttg aatctaaaac agaggagtca aacagtgcag 1200
agatgtcatg tcagatcaca gcaacaagta acggggaggg ccatggcatg aaccaagtc 1260
tgcaggccat gatgctgatg ggcttggggg atatcttctc aatgaacaaa gcaggagctg 1320
tgatgcattc tgggatgcag ataaacatgc aagccaagca gaattcttcc aaaaccacat 1380
ctaagagaag ggggaagaaa gtcaacatgg ctctgggggt cagtgtttt gacttgtcag 1440
aagggtgacg tgatgatgat gatgacgggt aggaggagga taatgacatg gataatagtg 1500
aatgaaagca gaaagcaaa taataaaatc acaaatgttt ggaaacaca aaagtaactt 1560
gtttatctca gtcgtacaa aaacagtaag gaggcagaaa gccaaagcact gcatttttag 1620
ggcaatcaca ttacatgac cgtatttctt atcattctac tttattctgc tacagaaaac 1680
gcgggagatt agccaagagt tattat

```

```

<210> 18
<211> 2140
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2349047CB1

```

```

<400> 18
aaaaagggtg acaaccggga aagtagactc accgtcttgg tctagagact gacccctgca 60
cagacagacc ccttccccctc tctgcgaaag gaccaagccc cagaagtcac tccatctcct 120
acggctcgca atttccagag gcccccctggc accttccagc ctgatgtcgt gcgtcaagtt 180
atggcccagc ggtgcccccg cccccttgggt gtccatcgag gaactggaga accaggagct 240
cgtcggcaca ggcgggttgc gcacagtgtt ccgggcgcaa cataggaagt ggggctacga 300
tgtggcggtc aagatcgtaa actcgtgagt gaccccggtt gacccagcc gcaatctggc 360
caaaaagggt gagccactgt gctctggggc ctgaatggcg aaggaggagg ttttcccacg 420
accccggtgc gactccagct ctctcctgga gtgtaggaa gcgatatcca gggagggtcaa 480
ggccatggca agtctggata acgaattcgt gctgcgccta gaagggttta tcgagaaggt 540
gaactgggca caagatccca agccggctct ggtgactaaa ttcattggaga acggctcctt 600
gtcggggctg ctgcagtcct agtgccctcg gccctggccg ctcttctgac gcttctgtaa 660
agaagtgtgt cttgggatgt tttacctgca cgaccagaac ccggtgctcc tgcaccggga 720
cctcaagcca tccaacgtcc tgctggaccc agagctgcac gtcaagctgg cagatttttg 780
cctgtccaca tttcaggag gctcacagtc agggacaggg tccggggagc cagggggcac 840
cctgggctac ttggcccag aactgtttgt taacgtaaac cgggaaggcct ccacagccag 900
tgacgtctac agcttcggga tcctaagtgt ggcagtgtct gctggaagag aagttgagtt 960
gccaaccgaa ccatcactcg tgtacgaagc agtgtgcaac aggcagaacc ggccttcatt 1020
ggctgagctg cccaagccg ggccctgagc tccggctta gaaggactga aggagctaat 1080
gcagctctgc tggagcagtg agcccaagga cagaccctcc ttccaggaat gctacacaaa 1140
aactgatgaa gtcttccaga tgggtggagaa caatatgaat gctgctgtct ccacggtaaa 1200

```

```

ggatttcctg tctcagctca ggagcagcaa taggagattt tctatcccag agtcaggcca 1260
aggagggaca gaaatggatg gcttttaggag aaccatagaa aaccagcaact ctcgtaataa 1320
tgtcatgggt tctgagtggc taaacaaact gaatctagag gagcctccca gctctgttcc 1380
taaaaaatgc ccgagcctta ccaagaggag cagggcacaa gaggagcagg ttccacaagc 1440
ctggacagca ggcacatctt cagattcgat ggccaaccc cccagactc cagagacctc 1500
aactttcaga aaccagatgc ccagccctac ctcaactgga acaccaagtc ctggaccocg 1560
aggggaatcag ggggctgaga gacaaggcat gaactggtcc tgcaggaccc cggagccaaa 1620
tccagtaaca gggcgaccgc tcgttaacat atacaactgc tctggggtgc aagttaggaga 1680
caacaactac ttgactatgc aacagacaac tgccttgccc acatggggct tggcaccttc 1740
gggcaagggg aggggcttgc agcaccccc accagtaggt tcgcaagaag gccctaaaga 1800
tcctgaagcc tggagcaggc cacagggttg gtataatcat agcgggaaat aaagcacctt 1860
ccaagcttgc ctccaagagt tacgagttaa ggaagagtgc cacccttga ggccctgac 1920
ttccttctag ggcagctctg cctgcccaca aactgacttt gtgacctgtc cccaggagt 1980
caataaacat gatggaata aagcaccttc caagcttgcc tccaagagtt acgagttaa 2040
gaagagtggc accccttgag gcccctgact tccttctagg gcagtctggc ctgcccacaa 2100
actgactttg tgacctgtcc cccaggagtc aataaacatg 2140

```

<210> 19
 <211> 1573
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2415617CB1

```

<400> 19
gccccacagc cggccctgcg acgcccgcct gggcagcacc gataaggagc tgaaggcagg 60
agccgcgcgc acgggcagcg ccccacagcg ccagggaccc cctggcagcg ggagccgcgg 120
gtcgagggtta tggatccagc gggcggcccc cggggcgtgc tcccgcggcc ctgccgcgtg 180
ctgggtgctgc tgaaccgcgc cggcggcaag ggcaaggcct tgcagctctt cgggagtcac 240
gtgcagcccc ttttggttga ggctgaaatc tccttcacgc tgatgctcac tgagcggcgg 300
aaccacgcgc gggagctggt gcggtcggag gagctgggccc gctgggacgc tctggtggtc 360
atgtctggag acgggctgat gcacgaggtg gtgaacgggc tcatggagcg gcctgactgg 420
gagaccgcca tcagaagcc cctgtgtagc ctcccagcag gctctggcaa cgcgtggca 480
gcttccttga accattatgc tggctatgag caggtcacca atgaagacct cctgaccaac 540
tgacagctat tgctgtgccc cgggtgtgtg tcacccatga acctgctgtc tctgcacacg 600
gcttcggggc tgcgcctctt ctctgtgtgc agcctggcct ggggcttcat tgctgatgtg 660
gacctagaga gtgagaagta tcggcgtctg ggggagatgc gcttcactct gggcaccttc 720
ctgcgtcttg cagccctgcg caccatccgc ggccgactgg cctacctccc tgtagggaaga 780
gtgggttcca agacacctgc ctccccggtt gtggtccagc agggcccggt agatgcacac 840
cttgtgccac tggaggagcc agtgccctct cactggacag tggtgcccga cgaggacttt 900
gtgctagtcc tggcactgct gcactcgcac ctgggcagtg agatgtttgc tgcacccatg 960
ggccgctgtg cagctggcgt catgcattct ttctacgtgc gggcgggagt gtctcgtgcc 1020
atgctgctgc gcctcttctt ggccatggag aagggcaggc atatggagta tgaatgcccc 1080
tacttgggtat atgtgcccgt ggtgccttc cgcttggagc ccaaggatgg gaaagggtgtg 1140
tttgcagtgg atggggaatt gatggtttag gaggccgtgc agggccagggt gcacccaaaac 1200
tacttctgga ttgtcagcgg ttgcgtggag ccccgcceca gctggaagcc ccagcagatg 1260
ccaccgccag aagagccctt atgacccttg ggccgcgctg tgccttagtg tctacttgca 1320
ggacccttcc tccttcctta gggctgcagg gectgtccac agctcctgtg ggggtggagg 1380
agactcctct ggagaagggg gagaaggtgg aggctatgct ttggggggac aggccagaat 1440
gaagtctctg gtcaggagcc cagctggctg gggccagctg cctatgtaag gccttctagt 1500
ttgttctgag acccccaccc cacgaaccaa atccaaataa agtgacattc ccagcctgaa 1560
aaaaaaaaaaa aaa 1573

```

<210> 20
 <211> 862
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 3815186CB1

<400> 20
 aaccacagaga gtaggggtggt catgattctg tgggtgggtgca ggcatgtttt cttagcatta 60
 tttaccatca tattacgtat aagaagctg acagtggaga gagattaaaa gcaggactat 120
 taggggatag agagtaattg gaggcctttt tataatgtgc agattcgtga tttttgaaaa 180
 gcatagcttt gattctgctt tctttttttt aacttgggtt tttaaaattt gcacacacac 240
 accactttat ggcaattctt aactgacatt caatgactta cttottttct tagaaaattt 300
 ccaccacatt tctatcccca agccaacata caatgtgaaa tgaaagccag tgcgtggagt 360
 gcagctgcta aaaattttca gcacagggtc ctttctgact ctgctcatga gatggtatca 420
 gccacccaat gactggcgta tcttggctct gtgtctttct tcttacgctg tgttaatgtg 480
 tttactttcc atttggcaga gagacaagag agacacctcc aacttcgaca aagagtccac 540
 cagacagcct gtggaactga cccccactga taaactcttc atcatgaact tggacaaaaa 600
 tgaatttgct ggcttctcgt atactaaccac agagtttgtc attaatgtgt aggtgaatgc 660
 agattcccat gctgagcctg tgtgtaaggc tgcaggctga atgtctatta tcaattccag 720
 tttccagga ttcaggtgct ctctgttggc atccgtcatg tggagagctt gtcttagagg 780
 gcttttcttt gtatgtatag cttgctagtt tgttttctac atttcaaaat gtttagttta 840
 gaataagtgct attgcccact ga 862

<210> 21
 <211> 2744
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5504544CB1

<400> 21
 ccggcccccgg gtcccggggt ctcctttcac atccagatcg ggctgacccg cgagttcgtg 60
 ctgttgcccg ccgcctccga gctggctcat gtgaagcagc tggcctgttc catcgtggac 120
 cagaagttcc ctgagtggtg cttctacggc ctttacgaca agatcctgct tttcaaacat 180
 gacccacagt cggccaacct cctgcagctg gtgcgctcgt ccggagacat ccaggagggc 240
 gacctggtgg agtggtgctg gtcggcctcg gccaccttcg aggacttcca gatccgcccg 300
 cagccctca cgggtgcactc ctatcgggcg cctgccttct gtgatcactg cggggagatg 360
 ctcttcggcc tagtgcgcca gggcctcaag tgcatggct gcgggctgaa ctaccacaag 420
 cgctgtgcct tcagcatccc caacaactgt agtggggccc gcaaacggcg cctgtcatcc 480
 acgtctctgg ccagtggcca ctgggtgcgc ctcgccacct ccgagtcctt gccctgcacg 540
 gctgaagagc tgagccgtag caccaccgaa ctctgcctc gccgtccccc gtcctcctct 600
 tctctctctt ctgcctcatc gtatacgggc cgccccattg agctggacaa gatgtgtctc 660
 tccaaggtca aggtgccgca caccttcttc atccacagct atacacggcc caccgtttgc 720
 caggcttgca agaaactcct caagggcctc ttccggcagg gcctgcaatg caaagactgc 780
 aagtttaact gtcacaaacg ctgcgccacc cgcgtcccta atgactgcct gggggaggcc 840
 cttatcaatg gagatgtgcc gatggaggag gccaccgatt tcagcgaggc tgacaagagc 900
 gccctcatgg atgagtcaga ggaactccgt gtcattccctg gctccactc agagaatgcg 960
 ctccacgcca gtgaggagga ggaaggcgag ggaggcaagg cccagagctc cctggggtag 1020
 atccccctaa tgagggtggt gcaatcgggt cgacacacga cgcggaaatc cagcaccacg 1080
 ctgcgggagg gttaggtggt tcattacagc aacaaggaca cgtgagaaa gcggcactat 1140
 tggcgctctg actgcaagtg tatcacgctc ttccagaaca acacgaccaa cagatactat 1200
 aaggaaatc cgctgtcaga aatcctcacg gtggagtcgg cccagaactt cagccttgtg 1260
 ccgcccggca ccaaccaca ctgctttgag atcgtcactg ccaatgccac ctacttcgtg 1320
 ggcgagatgc ctggcgggac tccgggtggg ccaagtgggc agggggctga ggccgcccgg 1380
 ggctgggaga cagccatccg ccaggccctg atgcccgta tcttccagga cgcaccacg 1440
 gccccaggcc acgcgcccc cagacaagct tctctgagca tctctgtgtc caacagtcag 1500
 atccaagaga atgtggacat tgccactgtc taccagatct tccctgacga agtgctgggc 1560
 tcagggcagt ttggagtggc ctatggagga aaacaccgga agacaggccg ggacgtggca 1620
 gtttaaggta ttgacaaact gcgcttccct accaagcagg agagccagct ccggaatgaa 1680
 gtggccattc tgcagagcct gcggcatccc gggatcgtga acctggagt catgttcgag 1740

```

acgcctgaga aagtgtttgt ggtgatggag aagctgcatg gggacatgtt ggagatgac 1800
ctgtccagtg agaagggccg gctgcctgag cgcctcacca agttcctcat caccagatc 1860
ctgggtggctt tgagacacct tcacttcaag aacattgtcc actgtgactt gaaaccagaa 1920
aacgtgttgc tggcatcagc agacccattt cctcaggatga agctgtgtga ctttggcttt 1980
gctcgcacatca tcggcgagaa gtcgttccgc cgctcagtgg tgggcacgcc ggctacctg 2040
gcacccgagg tgctgctcaa ccagggttac aaccgctcgc tggacatgtg gtcagtgggc 2100
gtgatcatgt acgtcagcct cagcggcacc ttccctttca acgaggatga ggacatcaat 2160
gaccagatcc agaacgccgc cttcatgtac ccggccagcc cctggagcca catctcagct 2220
ggagccattg acctcatcaa caacctgctg caggtgaaga tgcgcaaacy ctacagcgtg 2280
gacaaatctc tcagccaccc ctggttacag gagtaccaga cgtggctgga cctccgagag 2340
ctggagggga agatgggaga gcgatacatc acgcatgaga gtgacgacgc gcgtgggag 2400
cagtttgcag cagagcatcc gctgcctggg tctgggctgc ccacggacag ggatctcgg 2460
ggggcctgtc caccacagga ccacgacatg caggggctgg cggagcgcac cagtgttctc 2520
tgaggtcctg tgccctcgtc cagctgctgc cctccacagc ggttcttcac aggatcccag 2580
caatgaactg ttctagggaa agtgcttcc tgcccaaact ggatgggaca cgtggggagt 2640
ggggtggggg gagctatttc caaggccct ccctgtttcc ccagcaatta aaacggactc 2700
atctctggcc ccatggcctt gatctcagca aaaaaaaaaa aaaa 2744

```

<210> 22
 <211> 1266
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1511326CB1

```

<400> 22
ggggcgctga cgaagcggc ggcagcgggc agcggctctc gggctgcagg ctgggcaggg 60
tccccctcca cgctcctgcc gctgtctccc acgtccccc ggtgcggcgc caccatggcg 120
tocacggacg aggacggcac caacggcggc gcctcggagg ccggcgagga ccgggaggct 180
cccgccagc ggaggcgcc ggggttcttg gccaccgccc ggctcacctt ctacgacatc 240
gccatgaccg cggggtgtgt ggttctagct attgccatgg tacgttttta tatggaaaaa 300
ggaacacaca gaggtttata taaaagtatt cagaagacac ttaaatTTTT ccagacattt 360
gccttgcttg agatagttca ctgtttaatt ggaattgtac ctacttctgt gattgtgact 420
ggggtccaag tgagttcaag aatctttatg gtgtggctca ttactcacag tataaaacca 480
atccagaatg aagagagtgt ggtgcttttt ctggctcgct ggaactgtgac agagatcact 540
cgctattcct tctacacatt cagccttctt gaccacttgc catacttcat taaatgggccc 600
agatataatt tttttatcat cttatatcct gttggagtgg ctgggtgaact tcttacaata 660
tacgctgcct tgccgcagt gaaagaaaca ggaatgttt caataagact tcctaacaaa 720
tacaatgtct cttttgacta ctattatttt cttcttataa ccatggcatc atatatacct 780
ttgtttccac aactctattt tcatatgtta cgtcaaagaa gaaagggtgct tcatggagag 840
gtgattgtag aaaaggatga ttaaatgac tctgcaaaca aggtgctttt tccagaataa 900
ccaagattac ctgagtccaa gttttaataa caagaataaa caactttgtg aaatatcatg 960
gattgtatgg tttcttaaaa tataacttga gacacgtggt atttgccagt atttgtgttc 1020
ctcttgtgcc agatctattt tttaacaagaa ctgtgcaaat atcagtaact tttgggtagg 1080
tattgattat taggaaaata attaggtgta ttatctgggg gaaaaaaaaa cttttgctaa 1140
gttttttttg aaacatgctc aaagcttttt aatatcaatat ttagaaatta gtttaacgat 1200
ttactattat acctgctagt gatatttatg tgatatttat aaatgaaaat aaatgcaaaa 1260
ttatat

```

<210> 23
 <211> 594
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1519120CB1

```

<400> 23
gcggcgctta tccccctccg accatggccg acgacgacgt gctgttcgag gatgtgtacg 60
agctgtgcca ggtgatcgga aagggtccct tcagtgttgt acgacgatgt atcaacagag 120
aaactgggca acaatttgct gtaaaaattg ttgatgtagc caagttcaca tcaagtcacg 180
ggttaagtac agaaggtaag agatggattt caaatctaaa gcgggaagcc agtatctgtc 240
atatgctgaa acatccacac attgttagagt tattggagac atatagctca gatggaatgc 300
tttcatatggt tttcgaattt atggatggag cagatctgtg ttttgaatc gtaaagcgag 360
ctgacgctgg ttttgtgtac agtgaagctg tagccagcat cttagacaaa catagctgga 420
aacaacttgg agaccacctt aatacagctt tgagctcagc atgacttgaa tgtcttcaa 480
ttcattgccc tgactccttc tggctgaaga gcaagggacc tagtctcagg gatggagcag 540
ccatggctat ggcacaaaat aaagaatatg ctcaatgaaa aaaaaaaaaa aaaa 594

<210> 24
<211> 2280
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1673761CB1

<400> 24
cccaaacgtc tggaatatac tcgaaaaaag gagaatgagt tgtatgaatc attgatgaat 60
attgcccaacc gaaagcagga ggaaatgaag gatatgattg ttgagacact taataccatg 120
aaggaggaac ttctggatga tgctactaac atggagttaa aagacgtcat tgtccctgag 180
aatggagaac cagtaggcac cagagagatc aaatgctgca tccgacagat ccaggaactc 240
atcatctccc gacttaatac ggcagtggtt aataagctga tcagctcagt ggattacctg 300
agggaaagct tcgtcggaac cctggaacga tgtctgcaga gcctggagaa gtctcaggat 360
gtctcagttc acatcaccag taattatctc aaacagatct taaatgctgc ctatcatgtt 420
gaagtcacgt ttcactcagg gtgctcagtt acaaggatgc tatgggagca aatcaaacag 480
atcatccagc gcatcacatg ggtgagccca cctgccatca ctctggaaatg gaagagggaag 540
gtggcccagg aagccattga gagcctcagc gcctccaaat tggctaagag catttgacgc 600
caattccgga ctcggctcaa tagttcccac gaggtctttg cagcctcctt gcggcagctg 660
gaagctggcc actcaggccg gttagagaaa acggaagatc tatggctgag ggttcgga 720
gatcatgctc ccgcctggc ccgcctttct ctggaagct gttctttaca ggatgtcttg 780
cttcacgtga aacctaaact gggacaggaa ctgggccggg gccagtatgg tgtggtatac 840
ctgtgtgaca actggggagg acacttccct tgtgccctca aatcagttgt cctccagat 900
gagaagcact ggaatgatct ggcttttgaa ttctactata tgaggtctct gccgaagcat 960
gagcgatttg tggatctcca tggttcagtc attgactaca actatggttg tggctccagc 1020
attgctgtgc tctcatttat ggagcggcta caccgggata tctacacagg gctgaaggct 1080
gggctgaccc tggagacacg tttgcagata gcactagatg tgggtggagg aatccgcttc 1140
ctgcacagcc agggacttgt ccactcgtgat atcaaaactga aaaatgtgct gctggataag 1200
cagaaccgtg ccaagatcac tgacttagga ttctgcaagc cagaggccat gatgtcaggc 1260
agcattgttg ggacaccaat ccataatggc cctgaacttt tcacagggaa gtacgataat 1320
tccgtggatg tctacgcttt tggaaattct ttctgggata tctgtcagg ctctgtcaag 1380
ctccctgagg catttgagag gtgtgctagc aaagaccatc tctggaacaa tgtgcggagg 1440
ggggtctgcc cagaacgtct tctgtgttt gatgaggagt gctggcagtt gatggaagcc 1500
tgttgggatg gcgacccctt gaagaggcct ctcttgggca ttgtccagcc catgctccag 1560
ggcatcatga atcggctctg caagtccaat tctgagcagc caaacagagg actagatgat 1620
tctacttgaa agcaaaagacc ttctctcttc actctctagt tatttcttcc cccctcacct 1680
tttggccatg gggagaattt gacattttatt cactatagga cacactccca agggaaactg 1740
tgcttgctgg gaaacttgga accttcccag gcagggatga ctccctggaca gtgaagagtt 1800
gaatgactga gcataatcag cagctcactg aagcgccaag ctatcccttt agcaaaaaag 1860
tgtctcagat gtgtaaaagc tgaggaatgt ggtgttcttg cttcacaaat gaaaaggagg 1920
cagatgttac cattgtcttt tcaactgtata tacttctaag acagcaagcg ggacactgca 1980
gtggcaatag tgttaaaaaa tctcattctc atgatttttg gctctagcta ggaatagttt 2040
agtcaggact cagaaaaatt gagcttagtt ctgggattat gaaaacatga ggacaaaaac 2100
aataacttgt ggatgtcttg ttctgtctgt ctgcagccag gtatctcagg ttgcaatggg 2160
cagaagtccc agtgaggagg ctgaaacag agctatctgt tctcatagt gccagtgtgt 2220
ttacatttat aggaccacat atccctgggt tctgggggag gtttctactgt acacagccaa 2280

```

<210> 25
 <211> 1679
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1270442CB1

<400> 25
 gcgcgcgcgc ggcacatgcac tccgcgagcg ctgcgtgcgc caggaccccc acctgcgccca 60
 ggagctggcc tcaactggccc gcggctgcga ctgcgtgcgc ccctctcggg tcaagaagcg 120
 gctgaaggcc ttccagcagg ttccagacacg gaaagaagag cctctgcccc cggccacgag 180
 ccaaagcatt ccgaccttct acttccccag aggacgccc caggactccg tcaacgtgga 240
 tgcgctcatc agcaagatcg agagcacctt cgcgcgggtt cccacagaga gggccacat 300
 ggacgacatg ggcctgggtg ccaaggcctg cggctgcccc ctctactgga aggggcgcgt 360
 ctctctatggc gccggcgggg agcgcacggg ctccgtgtcc gtccacaagt tcgtcgccat 420
 gtggagaaaa atctccaga actgccaga cgacgcggcc aagttcgtcc atctgctcat 480
 gtagccccggc tgcaactacc tgggtgcagg gactttgtc cccttcttgc aggacgtgg 540
 gaacacgcac ccggggctgt cgttcctgaa ggaggcgtcc gagttccact cgcgctacat 600
 caccacggtc atccagcgga tcttctacgc cgtgaaccgg tcctgggtcc gcaggatcac 660
 ctgcgcgcag ctgcggagga gctccttctt gcagaatgtg gcgctgctgg aggaggaggc 720
 ggacatcaac cagctgaccc aattcttctc gtacgagcat ttctacgtca tctactgcaa 780
 gtctctgggag ctggacacgg accacgacct gctcatcgac gcggacgacc tggcgcgcca 840
 caatgaccac gccctttcta ccaagatgat agacaggatc ttctcaggag cagtcacacg 900
 aggcagaaaa gtgcagaagg aagggaagat cagctatgcc gactttgtct ggtttttgat 960
 ctctgaggaa gacaaaaaaa caccgaccag catcgagtac tggttccgct gcatggacct 1020
 ggacggggac ggcgccctgt ccatgttcga gctcgagtac ttctacgagg agcagtgccg 1080
 aagcgtggac agcatggcca tcgaggccct gcccttccag gactgcctct gccagatgct 1140
 ggacctggtc aagccgagga ctgaagggaa gatcacgctg caggacctga agcgtgcaa 1200
 gctggccaac gtcttcttcg acaccttctt caacatcgag aagtacctcg accacgagca 1260
 gaaagagcag atctccctgc tcagggacgg tgacagcggc ggccccgagc tctcggactg 1320
 ggagaagtac gcggccgagg agtacgacat cctggtggcc gaggagaccg cgggagagcc 1380
 ctgggaggac ggggttcgagg ccgagctcag ccctgtggag cagaagctga gtgcgctcgc 1440
 ctccccgctg gccagaggc ccttcttcga ggccccctca ccgctgggag ccgtggacct 1500
 gtacgagtac gcgtgcgggg acgaggacct ggagccgctg tgacgcggcc cgcgagaacg 1560
 ccgcccgggg ccgctcccc acgtgccacc accgggcccac cgcggtcgtg gtaaaaaactg 1620
 ttgtggaaaa tgagtgcggt tgtacggaat gataaacttt tattttattca aaaaaaaaaa 1679

<210> 26
 <211> 1053
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1877133CB1

<400> 26
 aaggaaagga gagaagggtt gtgaagggaa gcggaatgga agggaaagga ggtcccgtgg 60
 gacgctgggg tctggggcag agcaggtagc agcgtgctgc cctgacagct gtctccgctc 120
 ctgagattgt cagtggctgc tatgcagcag gtgcagcctg gtctctcact gactctctac 180
 tccacaaagg caacgactgg ccaaggcagt ggctggctct gggttacaca agtgacagca 240
 ctcaactaag tgagctggaa gacccaggag aaggcggagg ctgaggtgcc cacatgatca 300
 gcacagccag ggtacctgct gacaagcctg tacgcatcgc ctttagcctc aatgacgcct 360
 cagatgatac accccctgaa gactccattc ctttggctct tccagaatta gaccagcagc 420
 tacagcccct gccgccttgt catgactccg aggaatccat ggaggtgttc aaacagcact 480
 gccaaatagc agaagaatac catgaggtca aaaaaggaaat caccctgctt gagcaaaagga 540
 agaaggagct cattgccaag ttagatcagg cagaaaagga gaaggtggat gctgctgagc 600

```

tggttcggga attcgaggct ctgacggagg agaatcggac gttgaggttg gccagtcctc 660
aatgtgtgga acaactggag aaacttcgaa tacagtatca gaagaggcag ggctcgtcct 720
aactttaaat ttttcagtgt gagcatatca ggctgatgac tgccctgtgc tggccaaaag 780
atttttattt taaatgaata gtgagtcaga tctattgctt ctctgtatta cccacatgac 840
aactgtctat aatgagttaa ctgcttgcca gcttctagct tgagagaagg gatattttta 900
atgagatcat taacgtgaaa ctattactag tatatgtttt tggagatcag aattcttttc 960
caaagatata tgtttttttc ttttttagga agatatgata atgctgtaca acagggtaga 1020
aaatgataaa aatagactta ttgctgaccc cag 1053

```

```

<210> 27
<211> 1212
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2636759CB1

```

```

<400> 27
gacggcacgc aaggtcagcg tcacagatct gaccctaaaa ataggcctct gttgccagtc 60
ggggtggctg ggcgtgcggc tgctacatgc cccacggacc agaacctccc gacgcggcca 120
ggccccggca caccagctg cagaaaaggag agaaaatccc ttggctctaa aatgacatct 180
ggagaagtga agacaagcct caagaatgcc tactcatctg ccaagaggct gtcgccgaag 240
atggaggagg aaggggagga ggaggactac tgcacccctg gagcctttga gctggagcgg 300
ctcttcttga agggcagtc cagtagacac caggtcaacg aggtctggcc caagctctac 360
attggcgatg agggcagcgc gctggaccgc tataggctgc agaaggcggg gttcacgcac 420
gtgctgaacg cggcccacgg ccggttgaaac gtggacactg ggccccgact actaccgcca 480
catggacatc cagtaccacg gcgtggaggg ccgacgacct gccaccttt cgacctcagt 540
gtcttcttct acccgcgggc agccttcctc gacagagcgc taagcgacga ccacagtaag 600
atcctgggtc actgctcat gggccgcagc cggtcagcca ccttggctct ggcctacctg 660
atgatccaca aggacatgac cctgggtggc gccatccagc aagtggccaa gaaccgctgc 720
gtctctccga accggggctt tttgaagcag ctccgggagc tggacaagca gctggtgcag 780
cagaggcgac ggtcccagcg ccaggacggt gaggaggagg atgacaggga gctgtaggcc 840
gcactcacag ggccagcaga ggcacttggg gacagagggg agaggcagaa catagccctg 900
ccctaggact ccagagaagg gatgggtgaa ccgaagctcg actcttccaa acctcttctg 960
tcaacttccc catgtgtgct ggggacaggg aggaaccaga gctgcccccg gccagagctg 1020
agcgctcagc ctctcagcaa aatgggaggg acgggctccc cggctctggg tcacagagga 1080
gcatggccag ctgcaccaag tcacctgctt tggttttgtt tttttgtga gaaggagag 1140
ggaaaatttt ttaaattgtg gggcattatt tttgtaaaata tccttcgggc tttgttttaa 1200
aacaacaaaa aa 1212

```

```

<210> 28
<211> 3093
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2716815CB1

```

```

<400> 28
gcagagtgtc agcaggagcg cgagccagca agaggcgctc gcgcgatgtc cgggcccctg 60
agccgcggcg ctgagccagc cgggacggac atgcgcggga gggcgccgcg gggcagccgc 120
cgctcctccg ggggaatgaa agctactggt tgattttaaa gtgcctgggc ctacaggtt 180
tggagatgtc ccagaataag gcacaatgtc aatagcagga gttgctgctc aggagatcag 240
agtccatta aaaactggat ttctacataa tggccgagcc atggggaata tgaggaagac 300
ctactggagc agtcgcagtg agtttaaaaa caacttttta aatattgacc cgataaccat 360
ggcctacagt ctgaactctt ctgctcagga gcgcctaata ccacttgggc atgcttccaa 420
atctgctccg atgaatggcc actgctttgc agaaaatggc ccacttccaa agtccagctt 480

```

```

gcccccctctt cttattcccc caagtgaaaa cttgggacca catgaagagg atcaagttgt 540
atgtgggtttt aagaaactca cagtgaatgg ggtttgtgct tccacccctc cactgacacc 600
cataaaaaaac tccccttccc ttttcccctg tgccccctctt tgtgaacggg gttctagggc 660
tcttccaccg ttgccaatct ctgaagccct ctctctggat gacacagact gtgaggtgga 720
attcctaact agctcagata cagacttctt tttagaagac tctacacttt ctgatttcaa 780
atatgatgtt cctggcaggc gaagcttccg tgggtgtgga caaatcaact atgcataatt 840
tgatacccca gctgtttctg cagcagatct cagctatgtg tctgacaaa atggaggtgt 900
cccagatcca aatcctcctc cacctcagac ccaccgaaga ttaagaaggt ctcatctggg 960
accagctggc tcccttaaca agccagccat aaggatatcc aactgttgta tacacagagc 1020
ttctcctaac tccgatgaag acaaacctga ggttcccccc agagttccca tacctcctag 1080
accagtaaag ccagattata gaagatggtc agcagaagtt acttcgagca cctatagtga 1140
tgaagacagg cctcccaaag taccgccaag agaacctttg tcaccgagta actcgcgcac 1200
accgagctccc aaaagccttc cgtcttacct caatgggggtc atgccccga cacagagctt 1260
tgccccctgat cccaagtatg tcagcagcaa agcactgcaa agacagaaca gcgaaggatc 1320
tgccagtaag gttccttgca ttctgcccct tattgaaaat gggaagaagg ttagtccaac 1380
acattattac ctactacctg aacgaccacc atacctggac aaatatgaaa aattttttat 1440
ggaagcagaa gaaacaaatg gaggcgccc aatccagcca ttacctgctg actgcgggtat 1500
atcttcagcc acagaaaagc cagactcaaa aacaaaaatg gatctgggtg gccacgtgaa 1560
gcgtaaacat ttatcctatg tggtttctcc ttagaccttg gggctcatgt tcagcagagg 1620
ttacatagga gcaaatgggt ctcaattttc cagtttgatt gaagtgcaga gaaaaatccc 1680
ttagattgca aaataaaata gttgaactct ctgtcttcat gtggaaggtt tagagcagtt 1740
gtgagatgct gttatgctga gaaacctga ctttgttagt gttggaaaaa agtcttacia 1800
gtctataatt taaagatgtg atgggtggga ggggaggatg gggaagcttt ttatatatgc 1860
atacattaca tacctatata taaacttggt gtataacct agaccatagc tgcaggttaa 1920
ccaattagtt actatcgtag agtaatatat attcagaata ataaactcaa gctggagaaa 1980
tgagtccctga tagactgaaa attgagcaaa tggaagaaga tacagtattg tttagatcag 2040
aatcattaaa aaatattttt gtttagtaag tttgaagatt tctggctttt aggccttttc 2100
tattttgttc catttatttt tgcaggcaat cttttccatg gagggcaggg tatccattct 2160
ttaccatggg tgtacctgct taggttaaaa atcataccaa ggcctcatat ttcagggttt 2220
catgttgctg cttgttgagg gagggagagc aggttacttg gcaaccatat tgtcacctgt 2280
acctgtcaca catcttgaaa aataaaacga taatagaact agtgactaat tttcccttac 2340
agttcctgct tgggtccacc cactgaagta gctcatcgta gtgcgggccc tattagaggc 2400
agtggggttac gtttagactca gatggaaaag tattctaggt gccagtgtta ggatgtcagt 2460
tttacaaaaa aatgaagcaa tttagctatgt gattgagagt tattgtttgg ggatgtgtgt 2520
tgtgtgtttg cttttttttt ttagactgta ttaataaaca tacaacacaa gctggccttg 2580
tgttgctggt tccatttcag tatttctggt ggattgtttg ctttttaagt aaaacacttc 2640
tgacccatag ctacgtatgt ctgaattcca gaggtcacat cagcatcttt ctgctttgaa 2700
aactctcaca gctgtggctg cttcacttag atgcagtggg acacatagtt ggtgttccga 2760
ttttcacatc cttccatgta tttatcttga agagataagc acagaagaga aggtgctcac 2820
taacagaggt acattactgc aatgttctct taacagttaa acaagctgtt tacagtttaa 2880
actgctgaat attatttgag ctattttaaag cttattatat tttagtatga actaaatgaa 2940
ggttaaaaaa tgcttaagaa aaatgcactg atttctgcat tatgtgtaca gtattggaca 3000
aaggatttta ttcattttgt tgcattatgt tgaatatgtt cttttcatct taataaagtt 3060
ataatactta tttatgataa aaaaaaaaaa aaa 3093

```

【手続補正書】**【提出日】**平成13年9月26日(2001.9.26)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**発明の詳細な説明**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【発明の詳細な説明】****【0001】**

(技術分野)

本発明は、細胞内リン酸化反応のレギュレータの核酸配列およびアミノ酸配列に関し、神経疾患、細胞増殖異常及び自己免疫/炎症疾患の診断、治療並びに予防におけるこれらの配列の利用に関する。

【0002】

(発明の背景)

タンパク質の可逆リン酸化反応は、真核細胞の活性を制御するための主要なストラテジーである。キナーゼ及びホスファターゼは可逆リン酸化反応を調節する。それゆえにキナーゼ及びホスファターゼは細胞内シグナル伝導経路の重要な構成要素である。プロテインキナーゼは、細胞外シグナル(ホルモン、神経伝達物質、成長因子、分化因子等)、細胞周期チェックポイント(例えば有糸分裂イベントに関連するシグナル)及び環境または栄養ストレスに応じて、アデノシン3リン酸(ATP)から特定タンパク質ターゲットへ高エネルギーリン酸を移転させる。プロテインホスファターゼは、タンパク質からリン酸基を除去することによってキナーゼ効果を仲介する。

【0003】

通常哺乳動物細胞内で活性である10,000のタンパク質のうち1,000以上のタンパク質がリン酸化すると推定されている。一般に、タンパク質活性はリン酸化によって誘導されるものであり、これは分子のスイッチをオンにするのと類似している。スイッチをオンにすると、適正なプロテインキナーゼが代謝性

酵素、調節タンパク質、受容体、細胞骨格タンパク質、イオンチャネルまたはポンプ、或いは転写因子を活性化する。シグナル経路の下方制御が必要な場合には、脱リン酸化によってタンパク質活性が抑制される。キナーゼ及びホスファターゼの座標活性は、細胞増殖、細胞分化、細胞と細胞のコミュニケーション及び細胞周期等の基本過程を調整する。抑制されていないシグナル伝達は、炎症、癌、動脈硬化症、乾癬を含む様々な病状に関係してきた。

【0004】

プロテインキナーゼは、ヒドロキシル化したアミノ酸上でタンパク質受容体分子をリン酸化する。これらのキナーゼは、かなりよく知られているタンパク質群即ち著しく多彩な機能及び特異性を有するような酵素のスーパーファミリーから構成されている。プロテインキナーゼは通常、基質、調節分子または突然変異表現型のアスペクトに因んで命名される。基質に関しては、プロテインキナーゼは、チロシン残基（プロテインチロシンキナーゼ (PTK)）をリン酸化するものと、セリンまたはトレオニン残基（セリン/トレオニンキナーゼ (STK)）をリン酸化するものの2つに大別することができる。二重特異性及びホスホリラーゼセリン、トレオニン及びチロシン残基を有するプロテインキナーゼは殆どない。STK及びPTKには、両ファミリーの構造特性を有するものがある (Hardie, G. and S. Hanks (1995) The Protein Kinase Facts Book, Vol. 1:7-20, Academic Press, San Diego CA)。

【0005】

保存された250～300アミノ酸キナーゼドメインは殆ど全てのキナーゼに含まれており、このドメインは2葉構造に折り重なっている。キナーゼドメインの1次構造は保存されており、更に11サブドメインに細分することが可能である。キナーゼドメインの小さな方のN末端葉は、サブドメインIからIVを有し、主としてATP（またはGTP）ドナー分子の結合及び配向に関与している。大きな方のC末端葉は、サブドメインVIからXIを有し、タンパク質基質を結合し、 γ リン酸をATPからセリン、トレオニンまたはチロシン残基のヒドロキシル基へと移転させる。サブドメインVIは、2葉の橋渡しをする。11サブドメインには各々、固有のサブドメインに特有の固有のアミノ酸残基及びモチーフが含まれており、

高度に保存されている。(Hardie, G. and S. Hanks (1995) *The Protein Kinase Facts Book*, Vol. 1:7-20, Academic Press, San Diego CA)。特に2つのプロテインキナーゼサイン配列は、キナーゼドメイン内で同定されていた。第1の配列にはATP結合に関与する活性部位リシン残基(サブドメインII)が、第2の配列には触媒活性に重要なアスパラギン酸残基(サブドメインVI)が含まれている。キナーゼは、キナーゼドメインの側面に位置する或いはキナーゼドメインに挿入されたような種々のアミノ酸配列(通常5~100残基)によってファミリーに分類することもできる。キナーゼは、標的タンパク質を認識し、相互作用を及ぼすので、これら追加のアミノ酸配列は各キナーゼの調節に関与する。

【0006】

PTKは、膜内外または非膜内外のいずれかに分類し得る。膜内外PTKは、殆どの成長因子に対して受容体として機能する。成長因子は受容体チロシンキナーゼ(RTK)に結合し、RTKにRTK自体をリン酸化(自動リン酸化)させ且つ特定細胞内第2メッセンジャータンパク質もリン酸化させる。RTKを結合する成長因子には、表皮成長因子、血小板派生成長因子、線維芽細胞成長因子、肝細胞成長因子、インスリン及びインスリン様成長因子、神経成長因子、血管内皮成長因子及びマクロファージコロニー刺激因子がある。

【0007】

非膜内外PTKは、原形質膜受容体のサイトソルドメインを用いてシグナル伝達複合体を形成する。非膜内外PTKを介してシグナルを送る受容体には、サイトカイン及びホルモンのための受容体(成長ホルモン、プロラクチン等)及びT及びBリンパ球上の抗原特異受容体がある。多数の非膜内外PTKは、癌細胞内で突然変異型腫瘍遺伝子産物として先ず認識された。癌細胞内では、正常細胞の制御はもはやPTK活性化の条件ではなかった。公知の腫瘍遺伝子の約3分の1がPTKをコードする。細胞形質転換(腫瘍形成)がしばしばチロシンリン酸化活性の増加によって達成されることはよく知られている(Charbonneau and N.K. Tonks (1992) *Anno. Rev. Cell Biol.* 8:463-493)。従って、或る種の癌を制御する際にPTK活性の調節は重要なストラテジーとなり得る。

【0008】

STKは、非膜内外タンパク質である。STKは第2メッセンジャー依存プロテインキナーゼを有している。第2メッセンジャー依存プロテインキナーゼは、cAMP、cGMP、イノシトールトリリン酸、ホスファチジルイノシトール3,4,5-トリリン酸、cADPリボース、アラキドン酸、ジアシルグリセロール、カルシウム-カルモジュリン (CaM) 等の第2メッセンジャーの効果を主として仲介する。STKには、ホルモン誘導細胞反応の仲介に關与するcAMP依存プロテインキナーゼ (PKA) と、平滑筋構造の調節、グリコゲン破壊及び神経伝達に關与するCaM依存プロテインキナーゼと、リン酸化カスケードを介して細胞表面から核へのシグナル形質導入を仲介するマイトジェン活性化タンパク質 (MAP) キナーゼと、グリコゲン破壊及び種々の転写因子の活性化を仲介するジアシルグリセロール活性化プロテインキナーゼC (PKC) がある。PKC μ は、他のPKCと同様にPKCファミリーの新規メンバーであり、亜鉛フィンガー様の、エステル結合に必要なN末端領域に多システインモチーフを有し、ホルボールエステル独立キナーゼ活性の能力もある (Johannes, F.J. ら (1994) J. Biol. Chem. 269:6140-6148)。

【0009】

PKAは、ホルモン刺激作用に応じて細胞内で作製したcAMPによって活性化される。変異PKA発現は、癌、甲状腺障害、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、心血管疾患を含む種々の疾病及び疾患に關係している (Isselbacher, K.J. ら (1994) Harrison's Principles of internal Medicine, McGraw-Hill, New York NY, pp. 416-431, 1987)。CaM依存プロテインキナーゼは、細胞内の遊離カルシウム濃度に応じて、細胞内カルシウム受容体であるカルモジュリンによって活性化される。CaMキナーゼI及びCaMキナーゼIIは神経伝達の調節において重要な役割を果たしている。キナーゼは、アルツハイマー病等の神経疾患と、老化の認知効果に關連していた (Lynch, M.A. (1998) Prog. Neurobiol. 56:571-589 and Bonkale, W.L. ら (1999) Brain Res. 818:383-396等を参照)。CASKは、カルモジュリン依存プロテインキナーゼドメインを含む神経細胞表面タンパク質 (ニューレキシン) であり、脳シナプス原形質膜に比較的高濃度で存在している (ハラ, Y. ら (1996) J. Neurosci. 16:2488-2494)。CASKは、アルツハイマー病に關係するアミロイド前駆体タンパク質 (APP) を結合することが可能な複合体の一部を形

成し、APP処理において重要な役割を果たし得る (Borg, J.P. ら (1998) J. Biol. Chem. 273:31633-31636)。

【0010】

サイクリン依存プロテインキナーゼ (CDK) は、細胞周期を通じて細胞の進行を制御するSTKである。サイクリンは、CDKに結合し、CDKを活性化する小調節タンパク質である。次にサイクリンは有糸分裂過程に関与する選択されたタンパク質をリン酸化し、活性化する。CDKは、活性化されるために多数の入力を必要とする点で独特である。サイクリンに加えて、CDK活性化には特定のトレオニン残基のリン酸化及び特定のチロシン残基の脱リン酸化が必要である。細胞周期に関連するSTKの別のファミリーは、NIMA (never in mitosis) 関連キナーゼ (Nek) である。CDK及びNekは共に、動物細胞における微小管組織の中心即ち中心体の複製、成熟及び分離に関与している (Fry, A.M. ら (1998) EMBO J. 17:470-481)。

【0011】

MAPキナーゼは、細胞内シグナル伝達経路を調整する別のSTKファミリーからなる。MAPキナーゼは、リン酸化カスケードを介して細胞表面から核へのシグナル形質導入を仲介する。MAPキナーゼ経路を活性化する細胞外刺激には、表皮成長因子、紫外線、高浸透圧性媒体、熱ショック、内毒素性リポ多糖体、及び腫瘍ネクロシス因子及びインターロイキン-1等のプロ炎症性サイトカインがある。変異したMAPキナーゼの発現は、癌、炎症、免疫異常症、成長及び発達に影響する障害を含む種々の病状に関係している。

【0012】

アポプトosisは、細胞死へと導くような高度に調整されたシグナル伝達経路である。細胞死は、組織発達及びホメオスタシスにおいて重大な役割を果たす。本過程の統制解除は、自己免疫疾患、神経変性疾患及び癌を含む多数の疾患の病因に関連している。種々のSTKは、本過程において鍵となる役割を果たす。ZIPキナーゼは、N末端プロテインキナーゼドメインに加えてC末端ロイシンジッパードメインを含むSTKである。このC末端ドメインは活性化転写因子ATF4等の転写因子との相互作用と同様にキナーゼのホモ二量体化および活性化を仲介する外観

を呈し、活性化転写因子ATF4は、転写因子のタンパク質(ATF/CREB)ファミリーを結合するようなcAMP応答要素のメンバーである(サンジヨウ, H. ら (1998) J. Biol. Chem, 273:29066-29071)。DRAK1及びDRAK2は、死に関連するプロテインキナーゼ(DAPキナーゼ)と相同性を共有するSTKであり、インターフェロン- γ 誘導アポトーシスにおいてそのように機能することが知られている(前出のサンジヨウらの文献)。ZIPキナーゼと同様に、DAPキナーゼにはN末端キナーゼドメインに加えてC末端タンパク質-タンパク質相互作用ドメインがアンキリン反復の形で含まれている。このタイプのキナーゼ、ZIP、DAP及びDRAKは、NIH3T3細胞に形質移入された場合にアポトーシスに関連する形態学的変化を誘導する(前出のサンジヨウらの文献)。しかしながら、これらのタンパク質のN末端キナーゼ触媒ドメインまたはC末端ドメインのいずれかが欠失しているとアポトーシス活性が完全に無くなり、アポトーシスには、恐らくはレギュレータまたは特定の基質との相互作用ドメインとしてC末端ドメインにおける活性もキナーゼ活性に加えて必要である。

【0013】

RICKは、死受容体CD95に關与する特定のアポトーシス経路を仲介するものとして最近同定されたもう1つのSTKである(イノハラ, N. ら (1998) J. Biol. Chem. 273:12296-12300)。CD95は、腫瘍ネクロシス因子受容体スーパーファミリーのメンバーであり、免疫系の調節及びホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている(ナガタ, S. (1997) Cell 88:355-365)。CD95受容体シグナル伝達経路は、リガンド結合に続く受容体複合体への種々の細胞内分子の漸増に關与している。これにはシステインプロテアーゼカスパーゼ-8が含まれ、カスパーゼ-8は細胞死へ導くカスパーゼカスケードを活性化する。RICKは、N末端キナーゼ触媒ドメイン及びC末端「カスパーゼ漸増」ドメインからなる。C末端「カスパーゼ漸増」ドメインはカスパーゼ様ドメインと相互作用し、RICKがカスパーゼ-8の漸増において役割を果たしていることを示している。この解釈は、ヒト293T細胞におけるRICKの発現が、CD95アポトーシス経路に關与する種々のタンパク質によってカスパーゼ-8の活性化を促進してアポトーシスの誘導を強化するという事実裏付けられている(前出のイノハラらの文献)。

【0014】

プロテインホスファターゼは、キナーゼにより活性化した分子からリン酸基を除去することによってプロテインキナーゼの効果を調整する。ホスファターゼは、ホスファターゼの好適なホスホアミノ酸基質に基づいてチロシン特異またはセリン/トレオニン特異のいずれかとして特徴付けられる。尤も、セリン/トレオニン基及びチロシン基の両方に対して二重特異性を有するプロテインホスファターゼもある。セリン/トレオニンホスファターゼは、ホスホセリン及びホスホトレオニン残基を脱リン酸化し、また多数のcAMP仲介ホルモン反応の重要なレギュレータでもある (Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58:453-508)。セリン/トレオニンホスファターゼは、通常2以上のサブユニットからなり、広範囲で重畳するタンパク質基質特異性を有する。

【0015】

チロシンホスファターゼは通常、主として原形質膜全域におけるシグナルの形質導入において機能する単遺伝子性タンパク質であり、膜内外受容体様タンパク質または可溶性非膜内外タンパク質のいずれかに分類される。チロシンホスファターゼは、PTKの効果を逆にするもので、リン酸化タンパク質のチロシン残基からリン酸基を除去し、細胞周期及び細胞シグナル伝達過程、リンパ球活性化及び細胞接着において重大な役割を果たす (Charbonneau, H. and N.K. Tonks (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:463-493)。細胞分裂の過程で、例えば、M期誘導ホスファターゼと呼ばれる特定のチロシンホスファターゼが、細胞分裂特異PTKであるCDC2の脱リン酸化及び活性化により、有糸分裂の誘導の際に鍵となる役割を果たしている (Krishna, S.ら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5139-5143)。

【0016】

チロシンホスファターゼは、活性部位を含む約250アミノ酸の保存触媒ドメインを共有する。活性部位コンセンサス配列は、ホスファターゼ活性に必須のシステイン残基を含む13アミノ酸を有する。更に、リンパ腫、小細胞肺癌、腺癌及び神経芽細胞腫を含む種々の腫瘍条件で転座または転位された染色体領域に、少なくとも8のチロシンホスファターゼをコードするような遺伝子がマッピング

されていた。(Charbonneau, H. and N.K. Tonks (1992) Annu. Rev. Cell Biol. 8:463-493)。既述の通り、多数のPTKが腫瘍遺伝子にコードされ、腫瘍はしばしばチロシンリン酸化活性の増加によって形成される。従って、細胞におけるチロシンリン酸化レベルを制御することによって、チロシンホスファターゼは細胞形質転換及び種々の癌の成長を予防または逆行させることが可能である。この仮説は、チロシンホスファターゼの過剰発現が細胞内で形質転換を抑制すること及びチロシンホスファターゼの固有の阻害剤が細胞形質転換を増進することを示す研究によって裏付けられている(前出のCharbonneau and Tonksの文献)。

【0017】

タンパク質リン酸化に加えて、脂質リン酸化も或る種のシグナル伝達経路において役割を果たす。ホスファチジルイノシトールのリン酸化は、PKCシグナル伝達経路の活性化に関与している。最近では、スフィンゴリピド代謝物質即ちスフィンゴシン-1-リン酸(SPP)が、細胞外作用及び細胞内作用を伴う新規な脂質第2メッセンジャーとして浮上してきた(コハマ, T. ら (1998) J. Biol. Chem. 273:23722-23728)。細胞外では、SPPはGプロテイン結合受容体EDG-I(内皮由来Gプロテイン結合受容体)に対するリガンドである。細胞内では、SPPは細胞の成長、生存、運動性及び細胞骨格変化を調整する。SPPレベルは、特にD-エリトロ-スフィンゴシンをSPPにリン酸化するようなスフィンゴシンキナーゼが調整する。細胞シグナル伝達におけるスフィンゴシンキナーゼの重要性は、血小板派生成長因子(PDGF)、神経成長因子及びPKCの活性化を含む種々の刺激がスフィンゴシンキナーゼの活性化によってSPPの細胞レベルを増加させるという事実と、酵素の拮抗阻害剤がPDGFによって細胞増殖誘導を選択的に阻害するという事実によって示される(前出のコハマの文献)。

【0018】

細胞内リン酸化の新規なレギュレータ及びそれをコードするポリヌクレオチドの発見は、神経疾患、細胞増殖異常及び自己免疫/炎症疾患の診断、予防並びに治療の際に有益な新規な成分を与えることによって本技術分野における要求に応える。

【0019】

(発明の概要)

本発明は、集合的には「HRIP」、個別には「HRIP-1」、「HRIP-2」、「HRIP-3」、「HRIP-4」、「HRIP-5」、「HRIP-6」、「HRIP-7」、「HRIP-8」、「HRIP-9」、「HRIP-10」、「HRIP-11」、「HRIP-12」、「HRIP-13」及び「HRIP-14」と呼ばれるような、実質上精製されたポリペプチドである細胞内リン酸化反応のレギュレータに特徴がある。或る側面において本発明は、(a)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドを提供する。或る例では、配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチドを提供する。

【0020】

また、本発明は(a)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドをコードする実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施例では、ポリペプチドは配列番号15乃至28からなる群から選択される。

【0021】

更に、本発明は(a)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドをコードする実質上単離されたポリヌクレオチドと機能的に結合したプロモータ配列からなる組換えポリヌクレオチドを提供する。或る例

では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。
また別の例では、本発明は組換えポリヌクレオチドからなる遺伝形質転換体を提供する。

【0022】

また、本発明は（a）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、（a）組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、（b）そのように発現したポリペプチドを受容する過程とからなり、組換えポリヌクレオチドは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からなる。

【0023】

更に、本発明は（a）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドに特異結合する実質上単離された抗体を提供する。

【0024】

更に、本発明は（a）配列番号15乃至28からなる群から選択したポリヌクレオチド配列、（b）配列番号15乃至28からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、（c）（a）に相補的なポリヌクレオチド配列、または（d）（b）に相補的なポリヌクレオチド配列からなる実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。
或る例では、ポリヌクレオチドは少なくとも60の連続したヌクレオチドからなっている。

【0025】

更に、本発明はサンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは（a）配列番号15乃至28からなる群から選択したポリヌクレオチド配列、（b）配列番号15乃至28からなる群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、（c）（a）に相補的なポリヌクレオチド配列、または（d）（b）に相補的なポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド配列を有する。検出方法は、（a）サンプル中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列からなる少なくとも16の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、（b）ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、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ような条件下で、プローブはポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。或る例では、プローブは少なくとも30の連続したヌクレオチドからなっている。別の実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチドからなっている。

【0026】

更に本発明は、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とからなる医薬品成分を提供する。有効量のポリペプチドは、（a）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる。更に本発明は、機能性HRIPの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程からなる方法を提供する。

【0027】

また、本発明は（a）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくと

も90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とからなる。或る例では、本発明は機能性HRIPの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程からなる方法を提供する。

【0028】

更に、本発明は(a)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至14からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる実質上単離されたポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とからなる。或る例で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とからなる医薬品成分を提供する。別の例では、機能性HRIPの過剰発現に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程からなる方法を提供する。

【0029】

更に本発明は、標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。標的ポリヌクレオチドは、配列番号15乃至28からなる群から選択した配列からなる。スクリーニング方法は、(a)標的ポリヌクレオチドからなるサンプルを化合物に曝す過程と、(b)標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とからなる。

【0030】

(発明を実施するための形態)

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明が限定されるものではなく、改変可能であるということを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施例を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ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併せて理解されたい。

【0031】

請求の範囲及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のものを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には単数または複数の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物等についても言及しているのである。

【0032】

本明細書中で用いる全ての専門用語及び科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料及び方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明に関係があるであろう細胞、プロトコル、試薬及びベクターについて説明及び開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

【0033】

定義

「HRIP」は、実質上精製されたHRIPのアミノ酸配列であって、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動物の種から得たもので

、任意の天然物、合成物、半合成物或いは組換え物を起源とするものを指す。

【0034】

「アゴニスト」の語は、HRIPの生物学的活性を強化または擬態する分子を指す。アゴニストの例として、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはHRIPと直接相互作用することによって、或いはHRIPが関与する生物学的経路の構成要素に作用することによって、HRIPの活性を調節する。

【0035】

「対立遺伝子変異体」は、HRIPをコードする遺伝子の別の形態である。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1の突然変異から作製し得る。また、変異RNAまたはポリペプチドからも作製し得る。ポリペプチドの構造または機能は、変異することもしないこともある。遺伝子は、天然の対立遺伝子変異体を全く有しないか、1若しくは数個の天然の対立遺伝子変異体を有し得る。一般に、対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は、ヌクレオチドの自然欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で1若しくは数回生じ得る。

【0036】

HRIPをコードする「変異(altered)」核酸配列は、種々のヌクレオチドを欠失、挿入または置換する核酸配列を有し、HRIPと同一またはHRIPの機能的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドを産出する。この定義に含まれるのは、HRIP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或いは検出困難な多型現象と、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列のための正常な染色体遺伝子座以外の遺伝子座に占めるような、対立遺伝子変異体に対する不適切或いは不測のハイブリダイゼーションである。コードされたタンパク質も「変異」し得るものであり、サイレント変化を生ぜしめて結果的に機能的に等価なHRIPとなるようなアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含み得る。計画的アミノ酸置換は、HRIPの生物学的また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/または両親媒性特性の類似性に基づき行い得る。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あり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとスレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

【0037】

「アミノ酸」または「アミノ酸配列」の語は、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またはその断片を指し、天然または合成分子を指す。ここで、「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に会合する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

【0038】

「増幅」は、核酸配列の追加複製に関連する。増幅は通常、当業者によく知られたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を用いて行う。

【0039】

「アンタゴニスト」の語は、HRIPの生物学的活性を阻害或いは弱める分子を指す。アンタゴニストとしては、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子またはその他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはHRIPと直接相互作用することによって、或いはHRIPが関与する生物学的経路の構成要素に作用することによって、HRIPの活性を調節する。

【0040】

「抗体」の語は、無損傷免疫グロブリンやその断片、例えばFa、F(ab')₂及びFvフラグメントを指すが、これらはエピトープの決定基と結合することができる。HRIPポリペプチドを結合する抗体は、無損傷ポリペプチドを用いるか或いは免疫抗原として感心のある小ペプチドを含む断片を用いるかして調製することができる。動物（マウス、ラット、ウサギ等）を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、翻訳または化学合成されたRNAに由来し得るもので、好みに応じて担体タンパク質に接合することも可能である。通常用いられる担

体であってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 等がある。結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

【0041】

「抗原決定基」の語は、特定の抗体と接触している分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域または3次元構造）に特異結合する抗体の産生を誘導し得る。抗原決定基は、抗体に結合するための無損傷抗原（即ち免疫応答を誘導するために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0042】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」鎖と塩基対を形成することが可能な任意の成分を指す。アンチセンス成分には、DNAや、RNAや、ペプチド核酸 (PNA) や、ホスホロチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸等の修飾されたバックボーン連鎖を有するオリゴヌクレオチドや、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖等の修飾された糖類を有するオリゴヌクレオチドや、或いは5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシン等の修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドがある。アンチセンス分子は、化学合成または転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が形成した天然の核酸配列と塩基対を形成し、転写または翻訳を妨害する二重鎖を形成する。「負」若しくは「マイナス (-)」の語がアンチセンス鎖を、「正」若しくは「プラス (+)」がセンス鎖を指すことがある。

【0043】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能また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、天然、組換えまたは合成のHRIP、或いはその任意のオリゴペプチドの能力であって、適切な動物または細胞において特定の免疫反応を誘導して特定の抗体と結合し得る能力を指す。

【0044】

「相補(的)」または「相補性」の語は、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドの、塩基対形成による自然結合を指す。例えば、配列「5'A-G-T3'」は、相補配列「3'T-C-A5'」に結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸が結合しているだけの「部分的」なものであるか、或いは一本鎖分子間に完全な相補性が存在するような「完全」なものであり得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に著しい影響を与える。このことは、核酸鎖間の結合に依存する増幅反応において、またペプチド核酸(PNA)分子の設計及び使用において特に重要である。

【0045】

「所定のポリヌクレオチド配列からなる成分」及び「所定のアミノ酸配列からなる成分」は、概して所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列からなる任意の成分を指す。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。HRIPまたはHRIP断片をコードするポリヌクレオチドからなる成分は、ハイブリダイゼーションプローブとして利用することができる。このプローブは凍結乾燥状態で保存し得るものであり、糖質等の安定化剤と会合し得る。ハイブリダイゼーションにおいては、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)及びその他の構成要素(例えばデンハート液、脱脂粉乳、サケの精子のDNA等)を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

【0046】

「コンセンサス配列」は、不必要な塩基を分離するために再配列し、XL-PCRキット(Perkin-Elmer, Norwalk, CT)を用いて5'方向、3'方向のいずれか一方向或いは両方向に伸長させ、更に再配列した核酸配列を指す。或いは、断片アセンブルのコンピュータプログラムを用いて、1若しくは数個のIncyteクローンの、場合によっては1若しくは数個のパブリックドメインESTの、オーバーラップした配列から組み立てた核酸配列を指す。コンピュータプログラムの例としては、GELVIEW断片アセンブルシステム(GCG, Madison WI)が挙げられる。伸長及びアセンブルの両方を行ってコンセンサス配列を決定する配列もある。

【0047】

「保存的なアミノ酸置換」は、置換がなされた時に元のタンパク質の特性を殆ど損なわないような置換、即ちタンパク質の構造と特に機能が保存され、そのような置換による大きな変化がない置換を指す。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換され得るアミノ酸と、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Ser
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

保存アミノ酸置換では通常、(a)置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えばβシートやαヘリックス構造、(b)置換部位における分子の電荷または疎水性、及び/または(c)側鎖の大部分を保持する。

「欠失」は、結果的に1若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドが失われなくなるようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0049】

「誘導体」の語は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の化学修飾を指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチド配列の化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持してい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)、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドから少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持しているプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

【0050】

「断片」は、HRIPまたはHRIPをコードするポリヌクレオチドの固有部分であって、親配列と同一配列であるが親配列よりも長さが短い配列を指す。断片は、画定された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5～1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸(またはポリペプチドの最初の25%または50%)から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

【0051】

配列番号15乃至28の断片には、固有のポリヌクレオチド配列領域が含まれる。この領域は、配列番号15乃至28を特異的に同定するものであり、例えば同一ゲノム中の配列番号15乃至28以外の配列とは異なるものである。配列番

号15乃至28の断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術において、或いは関連するポリヌクレオチド配列から配列番号15乃至28を区別する類似の方法において有用である。配列番号15乃至28の断片の正確な長さ及び断片に対応する配列番号15乃至28の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0052】

配列番号1乃至14の断片は、配列番号15乃至28の断片によってコードされる。配列番号1乃至14の断片には、配列番号1乃至14を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、配列番号1乃至14の断片は、配列番号1乃至14を特異認識する抗体を産出するための免疫原性ペプチドとして有用である。配列番号1乃至14の断片及び断片に対応する配列番号1乃至14の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0053】

「類似性」の語は、相補性の程度を指す。類似性には、部分類似性と完全類似性がある。「類似性」の語の代わりに「相同性」を用いることもある。同一の配列が標的核酸にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害するような部分相補配列は、「実質上類似」と称する。完全相補配列の標的配列へのハイブリダイゼーションの阻害は、緩やかなストリンジェント条件下で、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、溶液ハイブリダイゼーション等）を用いて検定し得る。実質上類似の配列また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条件下で、完全類似（同一）配列が標的配列に結合することに対して競合し、この結合を阻害し得る。これは、緩やかなストリンジェント条件が非特異結合を許容することを意味するものではない。緩やかなストリンジェント条件では、2つの配列相互の結合が特異的（即ち選択的）相互作用であることが必要なためである。非特異結合の不存在下では、部分的に相補性が欠失している（例えば類似性または相同性が約30%以下である）ような第2標的配列を用いて試験することができる。非特異結合の不存在下では、実質上類似の配列またはプローブは第2非相補的標的配列にハイブリダイズしな

い。

【0054】

ポリヌクレオチド配列に適用される「相同率」または「相同%」の語は、標準化された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以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、2つの配列をより有意に比較できる。

【0055】

ポリヌクレオチド配列間の相同率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定できる。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、一式の分子生物学分析プログラム(DNASTAR, Madison WI)である。CLUSTAL Vについては、Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153及びHiggins, D.G. ら (1992) CABIOS 8:189-191の文献に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対をなすアラインメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「類似率」として相同率を報告する。

【0056】

或いは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)が一般的に用いられ、且つ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している(Altschul, S.F. ら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。このアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」も

その1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列を対で直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn と 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、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータとして設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (1999年5月7日)を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

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

【0057】

相同率は、完全に画定された(例えば特定の配列番号で画定された)配列長さと比較して測定し得る。或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された配列から得られた断片(例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または200の連続したヌクレオチドの断片)の長さと比較して相同率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、相同率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0058】

高度の相同性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上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生成し得ることを理解されたい。

【0059】

ポリペプチド配列に適用される「相同率」または「相同%」の語は、標準化された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以上のポリペプチド配列間で一致する残基の割合を意味する。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の酸性度及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

【0060】

ポリペプチド配列間の相同率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているような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できる（既に説明したのでそれを参照されたい）。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定する。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスを選択する。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として相同率を報告する。

【0061】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えばポリペプチド配列を2つ1組で比較をする場合、デフォルトパラメータとして設定されたblastpと共に「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を使用してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

【0062】

相同率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）ポリペプチド配列の長さと比較して測定し得る。相同率は、配列或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された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または150の連続した残基の断片）の長さと比較して相同率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、或る長さであってその長さに対して相同率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0063】

「ヒト人工染色体」（HAC）は直鎖状の小染色体であり、6 kb～10 MbのサイズのDNA配列を含み、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が含まれている。

【0064】

「ヒト化抗体」の語は、非抗体結合領域におけるアミノ酸配列はヒト抗体により近づくように変異させた抗体分子であって、本来の結合能力はそのまま保持しているような抗体分子を指す。

【0065】

「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下で塩基対を形成することによって、一本鎖ポリヌクレオチドが相補的鎖とアニーリングするプロセスを指す。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、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を決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合（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。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定する。許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニーリング許容条件は

、例えば約 $6 \times \text{SSC}$ 、約1% (w/v) のSDS及び約 $100 \mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子DNAの存在下で温度68 において成立する。

【0066】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特異配列の融点 (T_m) より約5 ~ 20 低くなるように選択する。この T_m は、所定のイオン強度及びpHの下で、完全に一致するプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrook ら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYに記載されており、特に2巻の9章を参照されたい。

【0067】

本発明の、ポリヌクレオチドとポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに対する高ストリンジェンシー条件には、約 $0.2 \times \text{SSC}$ 及び約1%のSDS存在下で約68 において1時間の洗浄条件が含まれる。或いは、65 、60 、55 または42 の温度で行ってもよい。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約 $0.1 \sim 2 \times \text{SSC}$ の範囲で変化し得る。通常は、遮断剤を用いて非特異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 $100 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子DNAがある。特定条件下で、例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約35 ~ 50%v/vの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、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、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

【0068】

「ハイブリダイゼーション複合体」の語は、相補的塩基対間の水素結合の形成力によって2つの核酸配列間に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、溶解状態で形成し得る (C_0t または R_0t 解析等)。或いは、一方の核

酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体（例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラススライド、或いは他の適切な基質であって細胞若しくはその核酸が固定される基質）に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

【0069】

「挿入」及び「付加」の語は、1若しくは数個のアミノ酸残基またはヌクレオチド配列を各々付加するようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0070】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患または遺伝性疾患に関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞及び全身の防御系に作用し得る種々の因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、その他のシグナル伝達分子の発現によって特徴づけることができる。

【0071】

「マイクロアレイ」の語は、基質上の異なるポリヌクレオチドの配置を指す。

【0072】

「要素」または「アレイ要素」の語は、マイクロアレイの環境において、基質の表面上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。

【0073】

「調節(する)」の語は、HRIPの活性の変化を指す。調節することによって例えば、HRIPのタンパク質活性、結合特性その他の生物学的、機能的または免疫学的特性が増大または低下し得る。

【0074】

「核酸」及び「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」及び「核酸配列」の語は、ゲノム起源または合成起源のDNAまたはRNAであって一本鎖または二本鎖であるか或いはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るようなDNAまたはRNAや、ペプチド核酸（PNA）や、任意のDNA様またはRNA様物質を指すこともある。

【0075】

「機能的に結合した」は、第1核酸配列が第2核酸配列と機能的な関係があるように配置された状態を指す。例えば、プロモータがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモータはそのコード配列に機能的に結合している。同一の読み枠内で2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、一般に、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。

【0076】

「ペプチド核酸」(PNA)は、アンチセンス分子または抗遺伝子物質であって、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、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドからなるものを指す。末端のリジンは、成分に溶解性を与える。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNAに優先的に結合して転写の拡張を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞におけるPNAの寿命を延長し得る。

【0077】

「プローブ」は、HRIP、HRIPの相補配列またはこれらの断片をコードする核酸配列を指し、同一核酸配列、対立遺伝子核酸配列または関連する核酸配列の検出に用いられる。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に結合したものである。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ある。

【0078】

「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、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に延在し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による核酸配列の増幅(及び同定)に用い得る。

【0079】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるために長めのプロ

ープ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及びプライマーを用いてもよい。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。表、図面及び配列リストを含む本明細書に裏付けされた任意の長さのヌクレオチドを用いることができるものと理解されたい。

【0080】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. ら, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innisら (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego CA等を参照されたい。PCRプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA) を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

【0081】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのに有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(マサチューセッツ州ケンブリッジのWhitehead Institute/MITゲノム研究センターから一般向けに入手可能)ではユーザ

ーが「ミスプライミング・ライブラリ」をインプットすることができ、ここでプライマー結合部位として避けたい配列はユーザーが指定する。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。（後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、各自のソースから得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい。）PrimerGenプログラム（英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能）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し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存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の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイ要素として、或いは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

【0082】

「組換え核酸」は天然の配列ではない配列であり、或いは人為的に組み合わせなければ離隔している配列の2以上のセグメントを人為的に組み合わせで産出した配列を有する配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばのSambrookらの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモータ配列に機能的に結合した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、ベクターの不可欠な要素であって例えばある細胞を形質転換するために用いられるようなものであり得る。

【0083】

或いはこのような組換え核酸は、ウィルスベクターの不可欠な要素であって例えばワクシニアウィルスに基づくものであり得る。ワクシニアウィルスは組換え

核酸が発現する哺乳動物のワクチン接種に用いるもので、哺乳動物の防御免疫応答を誘導する。

【0084】

DNA配列に関する「RNA等価物」は、発生した窒素塩基チミンが全てウラシルに置換されていることと、糖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースから構成されていることを除いて、参照DNA配列と同一のヌクレオチド線形配列から構成されている。

【0085】

「サンプル」の語は、その最も広い意味で用いられる。HRIPをコードする核酸若しくはその断片、またはHRIP自体を含む疑いのあるサンプルは、体液や、細胞から単離された細胞、染色体、細胞小器官または膜からの抽出物や、細胞や、溶解しているか基質に結合しているゲノムDNA、RNAまたはcDNAや、組織や、組織プリント等から構成され得る。

【0086】

「特異結合」または「特異的に結合する」の語は、タンパク質またはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然成分または合成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（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存してい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の存在が、抗体に結合している標識されたAの量を低減させる。

【0087】

「実質上精製された」の語は、自然環境から取り除かれ、或いは単離または分離された核酸またはアミノ酸配列であって、自然に会合するその他の構成要素の少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、最も好ましいのは少なくとも約90%が遊離しているものを指す。

【0088】

「置換」は、1若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドを各々別のアミノ

酸またはヌクレオチドに置換することを意味する。

【0089】

「基質」は、任意の好適な固体または半固体の支持体を指すものであって、膜、フィルタ、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁性非磁性ビーズ、ゲル、管、プレート、ポリマー、微細粒子、毛管が含まれる。基質は、壁、溝、ピン、チャンネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基質表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0090】

「形質転換」は、外来性のDNAが宿主細胞に入り込み、宿主細胞を変化させるプロセスを表す。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、ウィルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された」細胞の語には、限られた時間内に挿入されたDNAやRNAを発現するような一時的に形質転換された細胞のみならず、安定的に形質転換された細胞であってその中に挿入されたDNAが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であるものも含まれる。

【0091】

ここで用いる「遺伝形質転換体」とは任意の有機体であり、限定するものではないが動植物を含み、有機体の1若しくは数個の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られている形質転換技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウィルスの導入によって行う。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いはin vitro受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知ら

れている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような有機体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookら（1989）等の参考文献に与えられている。

【0092】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体（前述）、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多形性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの交互スプライシングによって通常多数の或いは僅かな数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種相互に異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多形性変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。また、多形性変異体は、1つのヌクレオチド塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する「単一ヌクレオチド多形性」（SNP）を含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

【0093】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の相同性を有するポリペプチド配列として画定される。ここで、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の

相同性を示し得る。

【0094】

発明

本発明は、新規なヒトの細胞内リン酸化反応のレギュレータ（HRIP）、HRIPをコードするポリヌクレオチド、並びにこれらの成分を神経疾患、細胞増殖異常及び自己免疫／炎症不全の診断、治療又は予防のために利用する方法の発見に基づくものである。

【0095】

表1は、HRIPをコードする完全長のヌクレオチド配列の構築に用いたIncyteクローンを示す。列1及び列2は、ポリペプチド及びポリヌクレオチドの配列番号（SEQ ID NO）を各々示している。列3はIncyteクローンを示しており、各HRIPをコードする核酸はここで同定されたものである。列4はcDNAライブラリを示しており、列3のクローンはここから単離したものである。列5は、Incyteクローン及びこれに対応するcDNAライブラリを示している。cDNAライブラリが示されていないIncyteクローンは、プールされているcDNAライブラリから得た。列5のIncyteクローンをを用いて各HRIPのコンセンサスヌクレオチド配列を構築した。列5のIncyteクローンは、ハイブリダイゼーション技術における断片として有用である。

【0096】

表2の列は、本発明の各ポリペプチドの様々な特性を示している。列1は配列番号（SEQ ID NO）を、列2は各ポリペプチド中のアミノ酸残基の数を、列3は潜在的なリン酸化部位を、列4は潜在的なグリコシル化部位を、列5はサイン（signature）配列及びモチーフを有するアミノ酸残基を、列6はBLAST分析によって同定された相同配列、列7は分析方法と場合によってはその分析方法が利用できる検索可能なデータベースを示している。列7の分析方法を用いて、配列相同性及びタンパク質モチーフから各ポリペプチドの特徴付けを行った。

【0097】

表3の列は、組織特異性と、HRIPをコードするヌクレオチド配列に関係がある疾患、障害または症状とを示している。表3の列1はヌクレオチドの配列番号を

、列2は列1のヌクレオチド配列の断片を示している。これらの断片は例えば、配列番号15乃至28を同定し、配列番号15乃至28と関連するポリヌクレオチド配列を区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅の技術において有用である。配列番号15乃至27では、これら断片によりコードされるポリヌクレオチドは、例えば免疫原性ペプチドとして有用である。列3は、HRIPを発現する組織全体に対するHRIP発現割合として、組織カテゴリーを示している。列4は、HRIPを発現する組織全体に対する割合として、HRIPをコードするヌクレオチド配列に関係がある疾患、障害または症状を示している。列5は、各cDNAライブラリをサブクローニングするために用いたベクターを示している。

【0098】

表4の列ではcDNAライブラリの作製に用いた組織の説明を示している。HRIPをコードするcDNAのクローンはcDNAライブラリから単離したものである。列1は、ヌクレオチドの配列番号を、列2はクローン単離起源であるcDNAライブラリを、列3は列2のcDNAライブラリに関連する組織の起源その他の記述的情報を示している。

【0099】

本発明には、HRIPの変異体も含まれる。好適なHRIPの変異体のアミノ酸配列は、HRIPアミノ酸配列と少なくとも約80%、または少なくとも約90%、或いは約95%もの相同性を有し、HRIPの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するような変異体である。

【0100】

本発明には、HRIPをコードするポリヌクレオチドも含まれる。或る例では、HRIPをコードする配列番号15乃至28からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列が本発明に含まれている。配列番号15乃至28のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列と同等の価値を有しているが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくシリボースから構成されている。

【0101】

本発明には、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列も含まれる。

具体的には、そのようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約80%、または少なくとも約90%、或いは約95%もの相同性を有する。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、HRIPの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するアミノ酸配列をコードし得る。

【0102】

当業者であれば、遺伝暗号の縮重の結果、HRIPをコードする多数のポリヌクレオチド配列（既知の遺伝子または天然の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないポリヌクレオチド配列もある）が作り出され得ることは理解できよう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって作り出され得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。これらの組合せは、天然のHRIPのポリヌクレオチド配列に適用されるような標準トリプレット遺伝暗号を基に作られるものであり、このような変異は全て明確に開示されているものと考えられる。

【0103】

HRIP及びその変異体をコードするヌクレオチド配列は通常、好適に選択されたストリンジェントな条件下で天然のHRIPのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、HRIPまたはその誘導体であって実質上異なるコドンの使用法があるもの、例えば天然に存在しないコドンの封入があるものをコードするヌクレオチド配列を作り出すことは有益であろう。宿主が特定のコドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコドンを選択することが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えることなくHRIP及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質上変更する別の理由には、天然の配列から作製される転写物より好ましい、例えば半減期が長いなどの特性を有するRNA転写物の作製がある。

【0104】

本発明には、HRIP、HRIP誘導体及びこれらの断片をコードするDNA配列又はこれらの断片を完全に合成化学によって作製することも含まれる。作製後、本技術分野でよく知られている試薬を用いて、この合成配列を任意の様々な入手可能な

発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いてHRIPまたはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘導し得る。

【0105】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載のポリヌクレオチド配列、特に配列番号15乃至28で示される配列及びそれらの断片にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列も含まれる。(Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399-407、Kimmel, A.R. (1987) Methods Enzymol. 152:507-511.等を参照。)ハイブリダイゼーション条件は、アニーリング条件及び洗浄条件を含めて「定義」に記載した。

【0106】

DNAシーケンシングの方法は本技術分野でよく知られており、本発明の何れの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用いることができ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD)において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA)及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Perkin-Elmer)等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Perkin-Elmer)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA)または本技術分野でよく知られている他の方法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本技術分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する。(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.等を参照。)

【0107】

HRIPをコードする核酸配列を、部分的ヌクレオチド配列を利用し且つ本技術分野でよく知られているPCR法をベースにした種々の方法を用いて伸長させ、プロモータ及び調節要素等の上流配列を検出することができる。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッド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方法である。(Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2:318-322等を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列からなる制限断片から得る(Triglia, T.ら (1988) Nucleic Acids Res 16:8186等を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に關与している。(Lagerstrom, M.ら(1991) PCR Methods Applic 1:111-119等を参照。)この方法では、PCRを行う前に多重制限酵素の消化及び連結反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については本技術分野で知られている。(Parker, J.D.ら (1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoterFinder(商標)ライブラリ(Clontech, Palo Alto CA)を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、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/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア(National Biosciences, Plymouth MN)或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

【0108】

完全長cDNAをスクリーニングする際は、大きめのcDNAを含むようにサイズ選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、ランダムに初回抗原刺激を受けたライブラリは、しばしば遺伝子の5'領域を有する配列を含み、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラ

りは、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【0109】

市販されているキャピラリー電気泳動システムを用いて、シークエンシングまたはPCR産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシークエンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なったヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで活性化される蛍光色素と、放出された波長の検出に利用するCCDカメラとを有し得る。出力及び光の強度は、適切なソフトウェア（Perkin-Elmer社のGENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATOR等）を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNAの小片のシークエンシングに特に適している。

【0110】

本発明の別の実施例では、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を、適切な宿主細胞内でHRIP、HRIPの断片またはその機能的等価物を発現させるような組換えDNA分子内でクローニングし得る。遺伝暗号固有の宿重に起因して、実質的同一或いは機能的等価のアミノ酸配列をコードするような別のDNA配列を作製してHRIPの発現に利用し得る。

【0111】

種々の目的でHRIPがコードする配列を変えるために、本発明のヌクレオチド配列を本技術分野で一般的に知られている方法を用いて組み換えることができる。ここで目的には、限定するものではないが遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、発現の調節がある。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド伸介定方向突然変異誘導を利用して、新規な制限部位の生成、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を行う突然変異を導入し得る。

【0112】

本発明のヌクレオチドは、MolecularBreedingTM (Maxygen Inc., Santa Clara CA. 米国特許第5,837,458号、Chang, C.-C.ら (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797、Christians, F.C.ら (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264、Cramer, A.ら (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319に記載)等のDNAシャッフリング技術の対象となり、HRIPの生物学的特性、例えば生物活性、酵素力、或いは他の分子や化合物との結合力等を変更または向上させ得る。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCR仲介再組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを生成するプロセスである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。このように、遺伝の多様性は「人為的」品種改良及び急速な分子の進化を経て創生される。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を再結合し、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と再結合し、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指図された制御可能な方法で最大化させることができる。

【0113】

別の実施例によれば、本技術分野でよく知られている化学的方法を用いて、HRIPをコードする配列の全部或いは一部を合成し得る。(Caruthers, M.H.ら (1980) Nucleic Acids Symp. Ser 7:215-223、Horn, T.ら (1980) Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232等を参照。)或いは、化学的方法を用いてHRIPそれ自体またはその断片を合成し得る。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。(Roberge, J.Y.ら (1995) Science 269:202-204等を参照。)自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ(Perkin Elmer)を用いて達成し得る。更にHRIPのアミノ酸配列またはその任意の一部は、直接合成する間、または他のタンパク質から得た配列またはその任意の一部と結合する間、或いはその両方を行っている間に変更し、変異型ポリペプチドを生成することが可能である。

【0114】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製可能である。(Chiez, R.M.and F.Z. Regnier (1990) Methods Enzymol. 182:392-421等を参照。)合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる。(Creighton. T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York, NY等を参照。)

【0115】

生物学的に活性なHRIPを発現させるために、HRIPをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入することができる。好適な発現ベクターとは即ち好適な宿主内で挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含むベクターである。必要な要素には、ベクター及びHRIP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プロモータ、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列がある。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。固有開始シグナルを用いて、HRIPをコードする配列をより効果的に翻訳することが可能もある。このようなシグナルには、ATG開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。HRIPをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。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、インフレームの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含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。発現の効率は、用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを包含することによって高めることができる。(Scharf, D. ら (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162.等を参照。)

【0116】

当業者によく知られている方法を用いて、HRIPをコードする配列と、好適な転写及び翻訳調節要素とを含む発現ベクターを構築することが可能である。この方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術及びin vivo遺伝子組換え技術がある。(Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYの4, 8, 16-17章、Ausubel, F.M. ら. (199

5) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York N

Yの9, 13, 16章等を参照。)

【0117】

種々の発現ベクター／宿主系を利用して、HRIPをコードする配列を保持及び発現し得る。限定するものではないがこのような発現ベクター／宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウィルス発現ベクター（例えばバキュロウィルス）に感染した昆虫細胞系や、ウィルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウィルスCaMVまたはタバコモザイクウィルスTMV）または細菌発現ベクター（例えばTiまたはpBR322プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系などの微生物等がある。本発明は、使用する宿主細胞によって限定されるものではない。

【0118】

細菌系では、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて多数のクローニングベクター及び発現ベクターを選択し得る。例えば、HRIP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には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT 1 プラスミド (Life Technologies) などの多機能大腸菌ベクターを用いることができる。HRIPをコードする配列の、ベクターの多数のクローニング部位への連結反応によって、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を同定する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における in vitro 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう。(Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509.等を参照。) 多量のHRIPが必要な場合、例えば抗体を生成する場合などには、HRIPの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導T5バクテリオファージプロモータまたは誘導T7バクテリオファージプロモータを含むベクターが使用できる。

【0119】

酵母の発現系を使用してHRIPを生成し得る。 α 因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモータ等の構成型或いは誘導型のプロモータを含む多数のベクターが、酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは*Pichia pastoris*に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質を分泌或いは細胞内への保持のいずれかに誘導し、安定した増殖のために外来配列の宿主ゲノムへの組込みを可能にする。(前出のAusubel (1995) の文献、Bitter, G.A. ら (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544、Scorer, C. A. ら (1994) *Bio/Technology* 12:181-144.等を参照。)

【0120】

植物系を使用してHRIPを発現することも可能である。HRIPをコードする配列の転写は、ウィルスプロモータ、例えば単独或いはTMV (タカマツ, N. (1987) *EMBO J* 6:307-311) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いられるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモータによって促進される。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモータまたは熱ショックプロモータを用いてもよい。(Coruzzi, G. ら (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680、Broglie, R. ら (1984) *Science* 224:838-843、Winter, J. ら (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105.等を参照。)これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とするトランスフェクションによって、植物細胞内に導入可能である。(『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp.191-196等を参照。)

【0121】

哺乳動物細胞においては、多数のウィルスベースの発現系を利用し得る。発現ベクターとしてアデノウィルスを用いる場合、HRIPをコードする配列は、後発プロモータ及び3連リーダー配列からなるアデノウィルス転写/翻訳複合体に連結反応され得る。可欠E1またはE3領域へウィルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でHRIPを発現する感染ウィルスを得ることが可能である。(Logan, J. and T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659を参照。)更に、ラウス肉腫ウィルス(RSV)エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタ

ンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【0122】

ヒト人工染色体 (HAC) を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を輸送することもできる。治療目的のために約 6 kb ~ 10 MbのHACを作製し、従来の輸送方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル) で供給する。(Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet.15:345-355.等を参照。)

【0123】

長期にわたり哺乳動物系内で組換えタンパク質を生成するためには、細胞株内のHRIPの安定発現が望ましい。例えば、発現ベクターであって複製発現因子、内在性発現因子、或いはその両者のウィルス起源を含むものと、同一或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用いて、HRIP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る。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約 1 ~ 2 日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0124】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、tk⁻単純細胞のために用いられるヘルペスウィルスチミジンキナーゼ遺伝子と、apr^r細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある。(Wigler, M. ら (1977) Cell 11:223-232、Lowy, I. ら (1980) Cell 22:817-823等を参照。) また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えば dhfrはメトトレキセートに対する耐性を与え、neorはアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロンに対する耐性を、patはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える。(Wigler, M. ら (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570、Colb

ere-Garapin, F. ら (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14 等を参照。) その他の選択可能遺伝子、例えば、代謝のための細胞要求を変える *trpB* 及び *hisD* は、文献に記載されている。(Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051 等を参照。) 可視マーカー、例えばアミノシアニン、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、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である。(Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131 等を参照。)

【0125】

マーカー遺伝子発現の存在 / 不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、HRIP 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、HRIP をコードする配列を含む形質転換細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定することが可能である。または単一プロモータ制御下で、HRIP をコードする配列とタンデムにマーカー遺伝子を配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

【0126】

一般に、HRIP をコードする核酸配列を含み且つ HRIP を発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、DNA-DNA 或いは DNA-RNA ハイブリダイゼーション、PCR 法、核酸或いはタンパク質の検出、定量、或いはその両方を行うための膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含むタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術がある。

【0127】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いて HRIP の発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、本技術分野で公知である。このような技術の例としては、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ (ELISA)

、ラジオイムノアッセイ (RIA)、蛍光活性化細胞選別 (FACS) などが挙げられる。HRIP上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位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、競合結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、本技術分野で公知である。(Hampton, R. ら (1990) Serological Methods, a Laboratory Manual. APS Press, St Paul, MN, Sect. IV、Coligan, J. E. ら (1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY、Pound, J.D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ等を参照。)

【0128】

多岐にわたる標識方法及び結合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。HRIPをコードするポリヌクレオチドに関連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或いはPCRプローブを産出する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR法がある。或いは、HRIPをコードする配列またはその任意の断片を、mRNAプローブを産出するためのベクターにクローニングすることも可能である。このようなベクターは、本技術分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、*in vitro*でRNAプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersham Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、U.S. Biochemical等から市販されている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、コファクター、阻害剤、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色素産生剤等がある。

【0129】

HRIPをコードするヌクレオチド配列を用いて形質転換した宿主細胞は、細胞培地からのタンパク質の回収及び発現に適した条件下で培養し得る。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列

、ベクター、或いはその両者に依存する。当業者であれば理解し得るように、HRIPをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、原核細胞膜または真核細胞膜を透過するHRIPの直接分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できる。

【0130】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断するような翻訳後処理を利用して、タンパク質のターゲティング、折りたたみ、及び/または活性を特定することも可能である。翻訳後の活性のための固有の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞（例えば CHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等）は、American Type Culture Collection（ATCC、Bethesda, MD）から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確実にするように選択し得る。

【0131】

本発明の別の実施例では、HRIPをコードする天然の核酸配列、変更核酸配列または組換え核酸配列を、上記任意の宿主系において融合タンパク質の翻訳をもたらす異種配列に連結反応させることができる。例えば、市販されている抗体を用いて認識可能な異種部分を含むキメラHRIPタンパク質は、HRIP活性阻害剤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、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分も、市販されている親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、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）がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素（HA）は、これらのエピトープ標識を特異的に認識す

る市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、融合タンパク質を遺伝子操作し、HRIPが精製後に異種部分から切断され得るように、HRIPコード配列と異種タンパク質配列の間にタンパク質分解切断部位を含めることもできる。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のAusubel (1995) 10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

【0132】

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またはコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて、放射能標識したHRIPの合成がin vitroで可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモータと機能的に結合したタンパク質コード配列の転写及び翻訳を結合する。翻訳は、放射能標識したアミノ酸前駆体、例えば³⁵Sメチオニンの存在の下で起こる。

【0133】

HRIPの断片は、組換え手法によって作製するのみならず、固相技術を用いた直接ペプチド合成によっても作製し得る (前出のCreighton, pp.55-60.等を参照。) タンパク質合成は、手作業で行うか自動化し得る。自動化合成は、例えば431Aペプチドシンセサイザ (Perkin Elmer) を用いて行うことが可能である。HRIPの種々の断片は別々に合成し、後から結合させて完全長分子を形成する。

【0134】

(治療)

化学的及び構造的類似性、例えば配列及びモチーフとの関連における類似性が、HRIPの領域と細胞内リン酸化反応のレギュレータ間に存在する。更にHRIPの発現は、神経組織と、癌その他の細胞増殖異常症と、炎症及び免疫応答とに密接に関連している。従ってHRIPは、神経疾患、細胞増殖異常症及び自己免疫異常症 / 炎症性疾患において或る役割を果たすものと考えられる。HRIPの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、HRIPの発現または活性を低下させることが望ましい。また、HRIPの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、HRIPの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0135】

従って、或る実施例において、HRIPの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にHRIPまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例として神経疾患が含まれ、その中には癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性及びウィルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウィルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト-ヤコブ病及びガストマン-ストラウスラー-シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱その他の中枢神経系の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害(SAD)と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症(corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、また細胞増殖異常症も含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髓腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髓、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれ、また自己免疫異常症/炎症性疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジ

ソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウィルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれる。

【0136】

別の実施例では、HRIPまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むHRIPの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0137】

更に別の実施例では、実質的に精製されたHRIPを含む医薬品成分を好適な医薬用担体と共に患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むHRIPの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0138】

更に別の実施例では、HRIPの活性を調節するアゴニストを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むHRIPの発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0139】

更に別の実施例では、患者にHRIPのアンタゴニストを投与して、HRIPの発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例には、上記した神経疾患、細胞増殖異常症

及び自己免疫異常症／炎症性疾患がある。一実施態様においては、アンタゴニストとして直接的に、或いはHRIPを発現する細胞または組織に薬剤を輸送するターゲティングまたは輸送機構として間接的にHRIPと特異結合する抗体を用いることができる。

【0140】

別の実施例では、HRIPをコードするポリヌクレオチドの相補体を発現するベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むHRIPの発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0141】

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来の医薬原理に従ってを選択し得る。治療薬と組み合わせることにより、上記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらし得る。この方法を用いることにより少量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

【0142】

HRIPのアンタゴニストは、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造し得る。具体的には、精製されたHRIPを用いて抗体を作るか、治療薬のライブラリをスクリーニングして、HRIPと特異結合するものを同定することが可能である。HRIPの抗体も、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造することが可能である。限定するものではないがこのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片及びFab発現ライブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。

【0143】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、その他を含む種々の宿主は、HRIP、またはHRIPの任意の断片またはオリゴペプチドであって免疫原性の特性を有するものを注入することによって免疫化することができる。宿

主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウム等のミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール等の界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG（カルメット - ゲラン杆菌）及びコリネバクテリウム - パルヴムが特に好ましい。

【0144】

HRIPに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、少なくとも約5のアミノ酸からなり、一般的には少なくとも約10のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり且つ小さな天然の分子の全アミノ酸配列を含むことが望ましい。HRIPアミノ酸の短い伸長部は、別のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシニアンの配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0145】

HRIPに対するモノクローナル抗体は、抗体分子を産生する任意の技術を用いて、培地内の連続した細胞株によって作製し得る。限定するものではないがこのような技術には、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ある。（Kohler, G. ら. (1975) Nature 256:495-497、Kozbor, D. ら (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42、Cote, R.J. ら (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030、Cole, S.P. ら (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120等を参照。）

【0146】

更に、「キメラ抗体」を作製するために開発した技術、例えば好適な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを用いることが可能である。（Morrison, S.L. ら. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855、Neuberger, M.S. ら (1984) Nature 312:604-608、タケダ, S. ら (1985) Nature 314:452-454等を参照。）或いは

、一本鎖抗体を産生するために説明された技術を適用し、本技術分野で知られている方法を用いて、HRIP特異性一本鎖抗体を産生し得る。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる。(Burt on D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137等を参照。)

抗体の産生は、リンパ球集団における in vivo 産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る。(Orlandi, R. ら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837、Winter, G. ら (1991) Nature 349:293-299等を参照。)

【0147】

HRIPのための特異結合部位を有する抗体を産生することもできる。例えば、限定するものではないがこのような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製される $F(ab')_2$ 断片と、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を減らすことによって作製されるFab断片とがある。或いは、Fab発現ライブラリを作製することによって、モノクローナルFab断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる(Huse, W.D. ら (1989) Science 256:1275-1281等を参照。)

【0148】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる免疫放射線アッセイまたは競合結合アッセイに対する数々のプロトコルは、本技術分野において公知である。このようなイムノアッセイは通常、HRIPとその特異性抗体間の複合体形成の計測に關与している。2つの非干渉性HRIPエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いるような、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合アッセイを利用してもよい(前出のPoundの文献)。

【0149】

ラジオイムノアッセイ技術と共に様々な方法、例えばスキャッチャード分析を用いて、HRIPに対する抗体の親和性を評価する。親和性は結合定数 K_a で表す。 K_a

は、平衡状態においてHRIP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除した値であると定義する。ポリクローナル抗体は多様なHRIPエピトープに対する親和性が不均一であり、ポリクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、HRIP抗体の平均親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は特定のHRIPエピトープに対して単一特異的であり、モノクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が約 $10^9 \sim 10^{12}$ L/molの範囲にあるような高親和性抗体試薬は、HRIP抗体複合体が激しい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 値が約 $10^6 \sim 10^7$ L/molの範囲にあるような低親和性抗体試薬は、HRIPが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製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. and Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0150】

ポリクローナル抗体試薬の抗体価及び結合活性を更に評価して、或る下流の適用例に対するこのような試薬の品質及び適性を決定することができる。例えば、少なくとも $1 \sim 2$ mg/ml、好ましくは $5 \sim 10$ mg/mlの特異抗体を含むポリクローナル抗体試薬は、HRIP抗体複合体を沈殿させる必要がある処理において通常用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である。(前出のCattyの文献、同Coliganらの文献等を参照)。

【0151】

本発明の別の実施例では、HRIPをコードするポリヌクレオチド、HRIPの任意の断片または相補配列を治療目的で 사용할 ことができる。ある実施形態では、HRIPをコードするポリヌクレオチドの相補配列がmRNAの転写を阻止するのに好適である場合にこれを使用し得る。具体的には、HRIP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し得る。従って、相補的分子または断片は、HRIP活性を調節するため、または遺伝子機能を調節するために使用し得る。このような技術は既に本技術分野ではよく知られており、センスまたはアンチセンスオ

リゴヌクレオチドまたは大きな断片を、HRIPをコードする配列のコード領域または制御領域に延在する様々な位置から設計することが可能である。

【0152】

レトロウィルス、アデノウィルス、ヘルペスまたはワクシニアウィルス由来の発現ベクターまたは様々な細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、標的器官、組織または細胞集団にヌクレオチド配列を輸送することができる。当業者によく知られている方法を用いて、HRIP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ようなベクターを作製することができる。(前出のSambrookらの文献、同Ausubelらの文献等を参照。)

HRIPをコードする高レベルのポリヌクレオチドまたはその断片を発現するような発現ベクターを用いて細胞または組織を形質転換することによって、HRIPをコードする遺伝子を遮断することができる。このような作製物を用いて、翻訳不可能なセンス配列またはアンチセンス配列を細胞内に導入することができる。このようなベクターは、DNA内に統合されない場合であっても内在性ヌクレアーゼによって機能が損なわれるまでmRNA分子を転写し続けることができる。一過性の発現は、非複製ベクターを用いた場合には1か月間以上続き、好適な複製要素がベクター系の一部である場合には更に長い間続くことがある。

【0153】

上記した通り、遺伝子発現の調節は、HRIPをコードする遺伝子の5'即ち調節領域を制御するべく相補配列またはアンチセンス分子(DNA、RNAまたはPNA)を設計することによって得ることが可能である。転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いることが可能であり、転写開始部位とは例えば開始部位から数えて約-10と約+10の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合のために十分に広がる二重らせんの能力を阻止するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載されている。(Gee, J.E. ら (1994) in: Huber, B.E. and B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, pp.163-177等を参照。)相補配列またはアンチセンス分子もまた、転

写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するべく設計することができる。

【0154】

リボザイムは酵素性RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、ヌクレオチド鎖切断に先立つ相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションが関与している。例えば、組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子は、HRIPをコードする配列のヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒する。

【0155】

任意の潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含む、リボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。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、リボヌクレオチドが15～20の短いRNA配列を、オリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次的構造の特徴に対して評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの実施容易性をテストすることによって行うことができる。

【0156】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために本技術分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。任意の方法には、固相ホスホラミダイト化合物等のオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、HRIPをコードするDNA配列のin vitro及びin vivo転写によってRNA分子を産出し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモータを用いて多様なベクター内に組み入れることが可能である。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらcDNA作製物を、細胞株、細胞または組織内に導入することができる。

【0157】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにRNA分子を修飾することができる。限定するものではないが可能な修飾には、分子の5'末端、3'末端、ある

いはその両方においてフランキング配列を追加したり、分子の主鎖内において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または2' Oメチルを使用したりすることが含まれる。この概念は、PNAの産出に固有のものであり、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内在性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル - 、メチル - 、チオ - 及び同様の修飾をしたものに加えて、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン (queosine)、ワイブトシン (wybutosine) 等を包含することによる。

【0158】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、*in vivo*、*in vitro*及び*ex vivo*の使用に対して同程度に適している。*ex vivo*治療の場合、ベクターを患者から採取した肝細胞内に導入し、クローニング増殖して同一患者に自家移植で戻すことができる。トランスフェクション、リボソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる輸送は、本技術分野でよく知られている方法を用いて実行することができる。(Goldman, C.K. ら (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466.等を参照。)

上記の治療方法はいずれも、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル等の哺乳動物を含めて治療が必要な全ての対象に適用できる。

【0159】

本発明の追加実施例は、薬剤として許容できる担体と併せて、上記の任意の治療効果を得るための医薬品或いは無菌組成物の投与に関連する。このような医薬品成分は、HRIP、HRIPに対する抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはHRIP阻害剤から構成し得る。成分は、単体で投与するか、或いは少なくとも1の別の薬剤(例えば安定剤)と共に投与し得る。薬剤は、限定するものではないが生理食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、水など、任意の無菌の生体適合性医薬品担体中で投与し得る。成分は、患者に単独で、或いは他の薬剤、薬物またはホルモンと共に投与し得る。

【0160】

本発明に用いられる医薬品成分は、任意の数の経路によって投与することがで

き、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸がある。

【0161】

活性成分に加えてこれらの医薬品成分には、活性化合物を薬剤として許容できる好適な担体を有し得る。担体は、薬剤として使用可能なプレパレートへの活性化合物の処理を促進するような医薬品添加物及び補助剤からなる。製剤及び投与の技術については、Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に詳細に記載されている。

【0162】

経口投与の医薬品成分は、本技術分野でよく知られている、薬剤として許容できる担体を用いて、経口投与に適した量で調剤することが可能である。このような担体を用いることによって、医薬品成分を患者が摂取できるように錠剤、丸薬、糖衣剤、カプセル剤、液状薬、ゲル状薬、シロップ剤、泥状物、懸濁液等として製剤することが可能となる。

【0163】

経口投与の医薬品製剤は、活性化合物を固形の薬品添加物と結合させ、その結果として得られた顆粒の混合物を（オプションで、すりつぶした後で）タブレットまたは糖衣錠のコアが得られるように処理することによって、得ることができる。所望に応じて好適な医薬品添加物を加えることができる。好適な医薬品添加物には糖質またはタンパク質賦形剤があり、具体例としてはラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトールを含む糖類と、トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモその他の植物から採取されるでんぷんと、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またはカルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロースと、アラビアゴム及びトラガカントゴムを含むゴムと、ゼラチン及びコラーゲン等のタンパク質とが挙げられる。例えば架橋結合したポリビニルピロリドン、かんてん、アルギン酸またはアルギン酸塩（例えばアルギン酸ナトリウム）等の崩壊剤または可溶化剤を所望に応じて添加してもよい。

【0164】

糖衣錠コアは、濃縮糖溶剤等の好適なコーティングと共に用い得る。好適なコーティングにも、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポール(carbopol)ゲル、ポリエチレングリコール、及び/または二酸化チタン、ラッカー溶剤及び好適な有機溶媒または溶剤混合液等がある。製品の同定のため或いは活性化化合物の量即ち投与量を示すために、染料または色素を錠剤または糖衣錠に添加してもよい。

【0165】

経口投与に用いることができる医薬品製剤には、ゼラチンでできた密封ソフトカプセル及びグリセロールやソルビトール等のコーティングのみならず、ゼラチンでできたプッシュ-フィット型(push-fit)カプセルもあり得る。プッシュ-フィット型カプセルには、ラクトースまたはスターチ等の賦形剤や結合材と、タルクまたはステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤と、更にオプションで安定剤と混合されたような活性成分を含めることが可能である。ソフトカプセルにおいては、安定剤を用いて或いは安定剤を用いずに、脂肪油、溶液またはポリエチレングリコール溶液等の好適な溶液中で活性化化合物が溶解或いは懸濁し得る。

【0166】

非経口投与に適した医薬品製剤は、水溶液中で、好適にはハンス液、リンガー液、生理緩衝食塩水等の生理学的に適合性のあるバッファ中で製剤することができる。水性の注入懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストラン等の懸濁液の粘性を高める物質を有し得る。更に好適な油性の注入懸濁液として活性化化合物の懸濁液を製剤し得る。好適な親水性溶液または培地には、ごま油等の脂肪油またはオレイン酸エチル、トリグリセリド、リボソーム等の合成脂肪酸エステルがある。輸送のために非脂質ポリカチオンアミノポリマーを用いてもよい。高濃度溶液の調剤が可能となるように、化合物の溶解性を高める好適な安定剤または薬剤をオプションで懸濁液に含めてもよい。

【0167】

局所または鼻腔投与のために、特定の障壁に浸透する好適な浸透剤が製剤に用いられる。このような浸透剤は、本技術分野で通常に知られている。

【0168】

本発明の医薬品成分は、本技術分野でよく知られている方法、例えば従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣化、湿式粉碎、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥処理等を用いて製造し得る。

【0169】

医薬品成分は塩として製剤され、限定するものではないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等の多くの酸と共に形成可能である。塩は、対応する遊離塩基形に比べて水溶剤または他のプロトン溶剤に溶けやすい。別の場合では、薬剤は、1 mM ~ 50 mM ヒスチジン、0.1 % ~ 2 % スクロース、及び/または2 % ~ 7 % マンニトールを含み、pHの範囲が4.5 ~ 5.5であり、使用前に緩衝剤と結合するような凍結乾燥粉末とすることができる。

【0170】

医薬品成分は、調合が完了した後に、指定された症状の治療のために適当な容器に詰めて標識することができる。HRIPを投与するための投与の量、頻度及び方法がラベルに書かれることになる。

【0171】

本発明に用いるのに適した医薬品成分には、意図する目的を達成するために効果的な量の活性成分を含む組成物が含まれる。効果的な服用量は、当業者が自己の能力の範囲内で決定する。

【0172】

任意の組成物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において、先ず治療の有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量及び投与経路を決定することができる。

【0173】

治療上の有効投与量は、症状や容態を回復させるような活性成分量を参考にする。そのような活性成分の例としては、HRIPまたはその断片、HRIPの抗体、HRIPのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤がある。薬用有効度及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED₅₀（集団の

50%の医薬的有効量)または LD_{50} (集団の50%の致死量)を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比は、治療指数であり、 LD_{50}/ED_{50} 比として表すことができる。高い治療指数を示すような医薬品成分が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、 ED_{50} を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

【0174】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定するであろう。効果的なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持するべく、投与量及び投与を調節する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の通常健康状態、患者の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の配合、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い医薬品成分は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3～4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与してよい。

【0175】

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1～100,000 μ gであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及び輸送方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、タンパク質または阻害剤に対する処方とは異なる、ヌクレオチドに対する処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの輸送は、特定の細胞、状態、位置等に特異的なものとなることになる。

【0176】

(診断)

別の実施例では、HRIPの発現によって特徴付けられる疾患の診断のために、或いはHRIPやHRIPのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤で治療を受けている患者をモニターするためのアッセイにおいて、HRIPを特異的に結合する抗体が用いられることがある。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方

法と同じ方法で調合される。HRIPの診断アッセイには、抗体及び標識を利用してヒトの体液において或いは細胞や組織のエキスにおいてHRIPを検出する方法が含まれる。抗体は、修飾して或いは修飾しないで使用し、レポーター分子の共有結合性或いは非共有結合性の接着によって標識化し得る。多様なレポーター分子が本技術分野で知られており、それらを用いることができる。幾つかのレポーター分子については上記した。

【0177】

HRIPを測定するための様々なプロトコル、例えばELISA、RIA、FACS等が本技術分野において知られており、HRIP発現の修正レベル或いは異常レベルを診断する基準を提供する。複合体の形成に適した条件下でヒト対象等の正常な哺乳動物対象から採取した体液または細胞とHRIPに対する抗体とを結合させることにより、HRIP発現の正常値または標準値が決定される。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。対象内で発現したHRIPの量、制御、検体からの病変サンプルを標準値と比較する。標準値と対象との偏差が疾患を診断するパラメータとなる。

【0178】

別の実施例によれば、HRIPをコードするポリヌクレオチドを診断目的に用いることもできる。用いられることができ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、そしてPNAが含まれる。ポリヌクレオチドは、検体におけるHRIPの発現が疾患と相関し得るような該検体における遺伝子発現の検出及び定量に用いることができる。診断アッセイは、HRIPの不在、存在及び過剰発現を測定するために、そして治療インターベンション中にHRIPレベルの調製を監視するために用いることができる。

【0179】

ある実施形態では、HRIPをコードする核酸配列を同定するために、HRIPまたは近縁の分子をコードする、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ることができる。プローブが同定するのはHRIP、突然変異体または関連配列をコードするような、天然に存在する配列のみであるか否かは、プローブの特異性及びハイブリダイゼーション或い

は増幅のストリンジェンシーによって決定されることになる。ここで、プローブの特異性とは、プローブが高特異領域（例えば5'調節領域）からなるのか、低特異領域（例えば保存されたモチーフ）からなるのかということである。

【0180】

プローブはまた、関連する配列の検出にも用いることができ、その配列はHRIPをコードする任意の配列と少なくとも50%の相同性を有し得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAとすることができ、配列番号15乃至28の配列、或いはHRIP遺伝子のプロモータ、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

【0181】

HRIPをコードするDNAに対する特異的ハイブリダイゼーションプローブを作製する方法には、HRIPまたはHRIP誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を、mRNAプローブを作製するためのベクターにクローニングする方法が含まれる。mRNAプローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適なRNAポリメラーゼ及び好適な標識され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ために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーターの集団によって標識され得る。レポーター集団の例としては、 ^{32}P または ^{35}S 等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。

【0182】

HRIPの発現に関連する疾患を診断するために、HRIPをコードするポリヌクレオチド配列を用いることができる。限定するものではないがこのような疾患の例として限定するものではないがこのような疾患の例として神経疾患が含まれ、その中には癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化その他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症その他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神

経根炎、ウィルス性中枢神経系疾患と、クールー、クロイツフェルト - ヤコブ病及びガストマン - ストラウスラー - シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、精神薄弱その他の中枢神経系の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、季節型感情障害 (SAD) と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれ、また細胞増殖異常症も含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病 (MCTD)、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髓腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髓、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれ、また自己免疫異常症 / 炎症性疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群 (AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症 (APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化

症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウィルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれる。

HRIPをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法、ノーザン法、ドットプロット法やその他の膜ベースの技術と、PCR法と、ディップスティック (dipstick) 法、ピン及びマルチフォーマットELISA様アッセイと、変異HRIPの発現を検出するために患者から採取した体液または組織を利用するマイクロアレイとにおいて使用し得る。このような定性または定量方法は、本技術分野で公知である。

【0183】

或る形態では、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて、HRIPをコードするヌクレオチド配列が有効であろう。HRIPをコードするヌクレオチド配列は標準法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液または組織のサンプルに添加することができる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者サンプルのシグナル量が制御サンプルと比べて著しく変化している場合は、サンプル内のHRIPをコードするヌクレオチド配列の変異レベルは関連する疾患の存在を示している。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、或いは個々の患者の治療を監視するために用いることもできる。

【0184】

HRIPの発現に関連する疾患の診断基準を提供するために、発現のための正常あるいは標準概要を確立する。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件下で、動物或いはヒトの正常な対象から抽出した体液或いは細胞を、HRIPをコードする配列またはその断片と結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な対象から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た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患の存在を確定する。

【0185】

疾患の存在が確定され治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な対象に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返されるであろう。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示すことができる。

【0186】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する方法を提供したりし得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法または積極的な治療法を早くから利用して、癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。

【0187】

HRIPをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドを追加的に診断上利用することは、PCRの利用に關与し得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いはin vitroで産出し得る。オリゴマーは、好ましくはHRIPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはHRIPをコードするポリヌクレオチドと相補的ポリヌクレオチドの断片を含み、最適条件下で特定の遺伝子や条件を識別するべく利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェント条件下で、近縁のDNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

【0188】

HRIPの発現を定量するためにも用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅（coamplification）及び標準曲線から得た結果の補間が含まれる。（Melby, P.C.ら（1993）J. Immunol. Methods, 159:235-244、Duplaa, C.ら（1993）Anal. Biochem. 212:229-236等を参照。）目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または非色応答によって定量が迅速になるようなハイスループットフォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

【0189】

更に別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、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、多数の遺伝子の発現レベルを同時に監視し、遺伝的変異体、突然変異及び多型現象を同定することができる。この情報は、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、治療薬剤の活性を開発及び監視するために有用である。

【0190】

マイクロアレイは本技術分野でよく知られている方法を用いて準備し、使用し、そして分析する。(Brennan, T.M. ら (1995) の米国特許第5,474,796号、Schena, M. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler ら (1995) のPCT出願第W095/251116号、Shalon, D. ら (1995) のPCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. ら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. ら (1997) の米国特許第5,605,662号等を参照。)

本発明の別の実施例では、天然のゲノム配列をマッピングする際に有効なハイブリダイゼーションプローブを産出するため、HRIPをコードする核酸配列を用いることが可能である。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる。(Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154等を参照。)

【0191】

蛍光原位置ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的染色体マッピング技術及び遺伝地図データと相関し得る。(Heinz-Ulrich, ら (1995) 前出のMeyers, pp. 965-968.等を参照。) 遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上のHRIPをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、その疾患に関係するDNAの領域を画定する

のに役立つであろう。健常者、保有者、感染者の三者間における遺伝子配列の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0192】

確定した染色体マーカーを用いた結合分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位置ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。マウス等、別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていない場合でも関連するマーカーが明らかになるであろう。新規の配列は、物理的マッピングによって染色体アームに割付け可能である。このことは、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患を調査する研究者にとって価値ある情報である。疾患または症候群が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域に対するいかなるマッピングも、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を表すことができる。(Gatti, R.A. ら (1988) Nature 336:577-580等を参照。) 転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0193】

本発明の別の実施例では、種々の薬剤スクリーニング技術を以って化合物のライブラリをスクリーニングするために、HRIP、HRIPの触媒作用断片、免疫原断片、またはそのオリゴペプチドを用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになる。HRIPとテストされる薬剤との結合複合の形成は計測できる。

【0194】

別の薬剤スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる。(Geysen, ら (1984) のPCT出願番号 W084/03564等を参照。) この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基質上で合成する。試験用化合物は、HRIP或いはその断片と反応させ、洗浄する。次に、本技術分野でよく知られている方

法で、結合したHRIPを検出する。精製したHRIPはまた、上記した薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

【0195】

別の実施例では、競合薬スクリーニングアッセイを用いることができる。このアッセイでは、HRIPを結合することができる中和抗体が、HRIPを結合するための試験化合物と特異的に競合する。この方法では、抗体が、1若しくは数個の抗原決定因子をHRIPと共有するペプチドの存在を検出する。

【0196】

別の実施例では、新規技術が現在知られているヌクレオチド配列の特性（限定するものではないがトリプレット遺伝暗号及び特異的塩基対の相互作用等を含む）に依存するのであれば、依然として発展すべきいかなる分子生物学技術においても、HRIPをコードするヌクレオチド配列を用いることができる。

【0197】

詳細説明を追加しなくとも、本技術分野の技術者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。従って、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的にすぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

【0198】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第60/125,593号、同第60/135,049号、同第60/143,188号は、言及することをもって本明細書の一部となす。

【0199】

（実施例）

1 cDNAライブラリの作製

RNAは、Clontech社から購入し、或いは表4に列記した組織から単離した。ホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解した組織もあり、また、ホモジナイズしてフェノールまたは好適な変性剤の混合液に溶解した組織もある。変性剤の混合液は、例えばフェノールとグアニジニウムイソチオシアネ

ートの単相溶液であるTRIZOL (Life Technologies) 等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムにおいて遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0200】

RNAの純度を高めるため、RNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNアーゼでRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子 (Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子 (QIAGEN, Valencia CA) またはOLIGOTEX mRNA精製キット (QIAGEN) を用いて、ポリ(A+) RNAを単離した。別法では、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A)PURE mRNA精製キット (Ambion, Austin TX) を用いて組織溶解物からRNAを直接単離した。

【0201】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、本技術分野で公知の推奨方法または類似の方法を用いて、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERScriptプラスミドシステム (Life Technologies) を用いてcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した。(前出のAusubel, 1997, unit 5.1-6.6等を参照。) 逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ(300~1000 bp) 選択は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー (Amersham Pharmacia Biotech)、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは、好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位に連結反応させた。好適なプラスミドは、例えばPBLUEScriptプラスミド (Stratagene)、pSPORT1プラスミド (Life Technologies) またはpINCY (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA) 等である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5α、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

【0202】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム (Stratagene) を用いたin vivo切除によって、或いは細胞溶解によって、プラスミドを宿主細胞から回収した。 MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム (Promega)、AGTC Miniprep精製キット (Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミドキットの中から少なくとも1つを用いて、プラスミドを精製した。沈殿させた後、0.1 mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥せずに、4で保管した。

【0203】

別法では、ハイスルーブットフォーマットにおいて直接結合PCR法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミド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は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素 (Molecular Probes, Eugene OR) 及びFluoroskan II蛍光スキャナー (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) を用いて蛍光分析的に定量した。

【0204】

3 シークエンシング及び分析

cDNAのシーケンス反応は、標準的方法或いはハイスルーブット装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Perkin-Elmer) またはPTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) をHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシーケンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬またはABIシーケンスキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer) に与えられた試薬を用いて準備した。cDNAのシーケンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシーケンスシステム (Molecular Dynamic

s) か、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シーケンシングシステム (Perkin-Elmer) か、或いはその他の本技術分野でよく知られている配列解析システムを用いた。cDNA配列の読み枠は、標準的方法 (前出のAusubel, 1997, unit 7.7) を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、本実施例5に記載した方法で配列を伸長させた。

【0205】

cDNA配列に由来するポリヌクレオチド配列は、当業者によく知られたアルゴリズムを利用するソフトウェアの組合せを用いて構築し、解析した。利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略、適用可能な説明、引用文献、閾値パラメータを表5に示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表5の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な引用文献であり、全文献はそっくりそのまま引用を以って本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は2つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す (スコアが高ければ高いほど2配列間の相同性が高くなる)。配列の解析は、MACDNASIS PROソフトウェア (日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA) 及びLASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて行った。

【0206】

ポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリA配列を除去することにより、またあいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング、及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。次に、BLAST、FASTA及びBLIMPSに基づくプログラムを用いて、プログラム中の注釈を得るべく、公共のデータベース、例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAMの選択に対する配列を問い合わせた。配列はPhred、Phrap及びConsedに基づくプログラムを用いて完全長のポリヌクレオチド配列に構築し、GenMark、BLAST及びFASTAに基づくプログラムを用いてオープンリーディングフレームに対してスクリーニングした。対応する完全長アミノ酸配列を誘導するべく完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳し、その後

、GenBankデータベース（上記）、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPrositate等のデータベース、PFAM等のHidden Markov Model（HMM）ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対する問合せによって完全長配列を分析した。HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を解析する確率的アプローチである。（Eddy, S.R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照。）

【0207】

完全長ポリヌクレオチド及びアミノ酸配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、配列番号15乃至28からのポリヌクレオチド配列の断片を同定するためにも使用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅に有用な約20～約4000のヌクレオチドの断片は、上記「発明」の項で説明した。

【0208】

4 ノーザン分析

ノーザン分析は、転写された遺伝情報の存在を検出するために用いられる実験技術であり、標識されたヌクレオチド配列の、特定の細胞種または組織からのRNAが結合される膜へのハイブリダイゼーションに関与している。（前出のSambrook, 7章、同Ausubel, F.M. ら, 4章及び16章等を参照。）

【0209】

BLASTに適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq（Incyte Pharmaceuticals）等のヌクレオチドデータベースにおいて同一または関連分子を検索する。ノーザン分析は、多数の膜系ハイブリダイゼーションよりも断然速い。更に、特定の同一を厳密な或いは相同的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準はプロダクトスコアであり、次式で定義される。

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

プロダクトスコアは、2つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両方を考慮している。例えば、プロダクトスコアが40であれば誤差1～2%以内の精度で一致し、プロダクトスコアが70であれば正確に一致することになる。類似分子は通常、15～40のプロダクトスコアを示す分子を選択することにより同定

する。それ以下のスコアでは、関連分子を同定し得る。

【0210】

ノーザン分析の結果は、HRIPをコードする転写物が作出されたライブラリの分布パーセンテージとして報告される。分析は、器官／組織及び疾患によるcDNAライブラリのカテゴリー分類に關与している。器官／組織のカテゴリーには、心血管、皮膚、発生、内分泌、胃腸、造血／免疫、筋骨格、神経、生殖及び泌尿器がある。疾患／病状のカテゴリーには、癌、炎症、外傷、細胞増殖、神経、貯留（pooled）が含まれる。カテゴリー毎に目的の配列を発現するライブラリ数を数え、それを全カテゴリーのライブラリ数で除した。組織特異発現及び疾患／病状特異発現のパーセント値を表3に示す。

【0211】

5 ポリヌクレオチドをコードするHRIPの伸長

配列番号15乃至28の完全長の核酸配列は、完全長分子の適切な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該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さが約22～30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68～72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア（National Biosciences）或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

【0212】

配列を伸長するために、選択されたヒトcDNAライブラリを用いた。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマー或いはプライマーのネステッドセットを設計した。

【0213】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー（MJ Research, Inc.）を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液には、DNA鋳型、各プライマー200nmol

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バッファと、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) が含まれていた。プライマー対PCI A、PCI Bに対して用いたパラメータは次の通りである。

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、4を20回繰り返す

ステップ6 : 68 で5分間

ステップ7 : 4 で保存

プライマー対T7、SK+に対しては、上記パラメータに代え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、4を20回繰り返す

ステップ6 : 68 で5分間

ステップ7 : 4 で保存

【0214】

1X TEに溶解したPICOGREEN定量試薬 (0.25% (v/v) PICOGREEN, Molecular Probes, Eugene OR) 100 μ lと、希釈していないPCR産物0.5 μ lとを不透明な蛍光光度計プレート (Coming Costar, Acton MA) の各穴に分配し、DNAを試薬と結合可能なようにさせることによって各穴内のDNA濃度の測定を行った。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量するべくプレートをFluoroskan II (Lab systems Oy, Helsinki, Finland) でスキャンした。反応混合物のアリコート5~10 μ lを1%アガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。

【0215】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコ
レラウィルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI)
を用いて消化し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) への再連結反
応前に音波処理またはせん断した。ショットガン・シーケンシングのために、
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で分離し
、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega) で消化した。伸長させたクローン
をT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA) を用いてpUC 18ベクター (A
mersham Pharmacia Biotech) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene)
で処理して制限部位の張出部 (overhang) を満たし、コンピテント大腸菌細胞に
形質移入した。形質移入した細胞を抗生物質含有培地上で選択し、個々のコロニ
ーを選択してLB/2x carb液体培地の384穴プレート内において37℃で一晩培養
した。

【0216】

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PCRによってDNAを増幅した。その際用
いたパラメータは次の通りである。

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、4を29回繰り返す

ステップ6 : 72℃で5分間

ステップ7 : 4℃で保存

DNAは、上記のPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) によって定量した。DNAの回
収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20
%ジメチルスルホキシド (1 : 2, v/v) で希釈し、DYENAMIC energy transfer
sequencing primer及びDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) ま
たはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Per

kin-Elmer)を用いてシーケンシングした。

【0217】

同様に、上記手順と、伸長のために設計されたオリゴヌクレオチドと、適切なゲノムライブラリを用いて、5'調節配列を得るべく、配列番号15乃至28のヌクレオチド配列が用いられる。

【0218】

6 個々のハイブリダイゼーションの標識及び使用

配列番号15乃至28から得たハイブリダイゼーションプローブを利用して、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNAをスクリーニングする。約20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対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー50 pmolと、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ アデノシン3リン酸(Amersham Pharmacia Biotech)250 μCi と、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NEN, Boston MA)を結合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストランビードカラム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて実質的に精製する。

Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba1またはPvu II(DuPont NEN)のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【0219】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜(Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH)に移す。ハイブリダイゼーションは、40℃で16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば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に一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィーまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

【0220】

7 マイクロアレイ

化学結合方法及びインクジェット装置を用いて、基質の表面上でアレイ要素を合成することが可能である。（前出のBalteschweiler等を参照。）ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線の、機械的または化学的結合手順を用いて基質の表面に要素を配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正な数の要素を含み得る。ハイブリダイゼーション後にハイブリダイズされていないプローブを取り除き、スキャナーを用いて蛍光のレベル及びパターンを決定する。スキャンしたイメージを分析することで、マイクロアレイ上で要素にハイブリダイズする各プローブの相補性の度合い及び相対発生量を算定できる。

【0221】

完全長のcDNA、発現遺伝子標識（EST）またはこれらの断片は、マイクロアレイの要素を構成し得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片を、LASERGENEソフトウェア（DNASTAR）等の本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。本発明の核酸配列の1つに対応する完全長のcDNA、EST、またはこれらの断片、或いは本発明に関連するcDNAライブラリから任意に選択したcDNAを、ガラススライド等の好適な基質に配置する。cDNAは、例えばUV架橋剤を利用してスライドに固定してから、熱処理及び化学処理を施し、最後に乾燥させる（Schena, M. ら. (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. ら (1996) Genome Res. 6:639-645等を参照。）蛍光プローブを調製して、基質上の要素にハイブリダイゼーションするために用いる。基質は、上記した方法で分析する。

【0222】

8 相補的ポリヌクレオチド

HRIPをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的配列は、天然のHRIPの発現を検出し、低下させ、または阻害するために用いられる。約15～約30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4

.06ソフトウェア (National Biosciences)、及びHRIPをコードする配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモータがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、相補的オリゴヌクレオチドを設計して、HRIPをコードする転写物にリボソームが結合するのを阻害する。

【0223】

9 HRIPの発現

HRIPの発現及び精製は、細菌またはウィルスをベースにした発現系を用いて行うことができる。細菌でHRIPが発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモータを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモータには、lacオペレーター調節要素に関連するT5またはT7バクテリオファージプロモータ及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモータが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピルβ-Dチオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導されるとHRIPを発現する。真核細胞でのHRIPの発現は、一般にバキュロウィルスとして知られているAutographica californica核多面性ウィルス (AcMNPV) を昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に感染させて行う。バキュロウィルスの可欠ポリヘドリン遺伝子を、相同的組換え、或いは転移プラスミドの仲介に関与する細菌仲介遺伝子転移のどちらかによって、HRIPをコードするcDNAと置換する。ウィルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモータによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウィルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda (Sf9) 昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウィルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(Engelhard, E. K. ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照。)

【0224】

殆どの発現系では、融合タンパク質としてHRIPを合成するのに例えばグルタチ

オンSトランスフェラーゼ (GST) またはペプチドエピトープ標識、例えばFLAGや6-Hisを用いる。これらを用いることにより、未精製細胞溶解物から組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製を迅速に1ステップで行うことができる。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Pharmacia Biotech)。精製後、GSTの部分を特定の開発部位においてHRIPからタンパク質分解的に切断することが可能である。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いて免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂 (QIAGEN) 上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のAusubel (1995) 10章、16章に記載されている。これらの方法で精製したHRIPを直接用いて以下のアッセイを行うことができる。

【0225】

1.0 HRIP活性の実証

HRIPのキナーゼ活性は、 γ -標識 ^{32}P -ATPを用いた好適な基質のリン酸化反応と、 β ラジオアイソトープカウンタを用いた摂取放射能の定量によって決定する。HRIPは、タンパク質基質、 ^{32}P -ATP及び好適なキナーゼバッファを用いてインキュベートする。産物内に取り込まれた ^{32}P は電気泳動によって遊離 ^{32}P -ATPから分離され、取り込まれた ^{32}P を計数する。回収された ^{32}P の量は、このアッセイにおけるHRIPのキナーゼ活性に比例する。プロテインキナーゼによってリン酸化された特定のアミノ酸残基は、加水分解されたタンパク質のホスホアミノ酸分析によって決定する。

【0226】

或いは、HRIPのプロテインホスファターゼ活性を、p-ニトロフェニルリン酸 (PNPP) の加水分解によって決定する。HRIPは、37℃で0.1% b-メルカプトエタノールの存在下で、pH 7.5のHEPESバッファ内でPNPPと共に60分間インキュベートする。この反応は10NのNaOHを添加することで停止する。PNPPの加水分解によって生じた410nmにおける光の吸光度の増加は、分光光度計を用いて測

定する。光の吸光度の増加は、本アッセイのHRIP活性に比例する (Diamond, RH. ら (1994) Mol. Cell Biol. 14:3752-3762)。

【0227】

1.1 機能的アッセイ

HRIP機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでのHRIPをコードする配列の発現によって評価する。cDNAを、cDNAを高いレベルで発現する強いプロモータを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。選り抜きのベクターには、pCMV SPORTプラスミド (Life Technologies) 及びpCR 3.1プラスミド (Invitrogen) が含まれ、どちらもサイトメガロウィルスプロモータを有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 μ gの組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1 ~ 2 μ gのプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、cDNAの組換えベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取り込みを検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、プロピジウムヨウ化物によるDNA染色によって計測される核DNA内容物の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変化、及び蛍光複合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M. G. (1994) Flow Cytometry Oxford, New York, NY.に記述がある。

【0228】

遺伝子発現におけるHRIPの影響は、HRIPをコードする配列とCD64またはCD64-G

FPのいずれかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64または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) の保存領域と結合する。形質転換細胞と非形質転換細胞は、ヒトIgGまたはCD64に対する抗体 (DYNAL, Lake Success, NY) で覆われた磁気ビーズを用いて有効に分離することができる。mRNAは、本技術分野で公知の方法で細胞から精製することができる。HRIPその他の目的の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析或いはマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0229】

1.2 HRIP特異抗体の産生

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE; Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 182:488-495等を参照) または他の精製技術を用いて実質上精製されたHRIPを用いて、標準プロトコルでウサギを免疫化して抗体を産出する。

【0230】

或いは、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてHRIPアミノ酸配列を解析し、免疫原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。適切なエピトープ、例えばC末端付近或いは隣接する親水性領域にあるエピトープの選択については、本技術分野で公知である。(前出のAusubel, 1995, 11章等を参照。)

【0231】

通常、長さ約15残基のオリゴペプチドを、ABI 431A ペプチドシンセサイザ (Perkin-Elmer) を用いてFmocケミストリを用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫原性を高める(前出のAusubel, 1995等を参照)。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド-KLM複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗HRIP活性を検査するには、ペプチドまたはHRIPを基質に結合し、1%BSAを用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素で標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0232】

1.3 特異抗体を用いた天然のHRIPの精製

天然または組換えHRIPを、HRIP特異抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、抗HRIP抗体を活性化クロマトグラフィー用樹脂、例えばCNBr活性化セファロース（Amersham Pharmacia Biotech）と共有結合させることにより構築する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

【0233】

HRIPを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、HRIPを優先的に吸着する条件下（例えば、界面活性剤が存在する高イオン強度バッファ）でカラムを洗浄する。抗体とHRIPの結合を破壊する条件（例えばpH 2～3のバッファ、或いは尿素またはチオシアン酸塩イオン等の高濃度のカオトロブ剤）でカラムを溶出させ、HRIPを回収する。

【0234】

1.4 HRIPと相互作用する分子の同定

HRIPまたは生物学的に活性であるHRIP断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬で標識する。（Bolton A.E. and W.M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539等を参照。）マルチウェルプレートの穴の中に予め配列しておいた候補分子を、標識したHRIPと共にインキュベートして洗浄し、標識したHRIP複合体を有する全ての穴をアッセイする。HRIP濃度を変えて得たデータを用いて、候補分子とのHRIPの数、親和性及び会合の値を計算する。

【0235】

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発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行い得る。本発明について説明するにあたり特定の好適実施例に関連して説明を行ったが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載されている本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲内にあるものとする。

【0236】

(表の簡単な説明)

表1は、HRIPをコードする完全長の配列をアセンブルするために用いた、ポリペプチド配列及びヌクレオチド配列の配列番号 (SEQ ID NO)、クローン識別番号 (クローンID)、cDNAライブラリ及びcDNA断片を示す。

【0237】

表2は、潜在モチーフと、相同配列と、HRIPの解析に用いた方法、アルゴリズム及び検索可能なデータベースとを含む各ポリペプチド配列の特徴を示す。

【0238】

表3は、各核酸配列の選択された断片と、ノーザン分析によって決定された各核酸配列の組織特異的発現パターンと、これらの組織に関連した疾患、異常症状または症状と、各DNAのクローニング先のベクターとを示す。

【0239】

表4は、cDNAライブラリの作製に用いた組織を示す。HRIPをコードするcDNAクローンはここから単離した。

【0240】

表5は、HRIPの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、引用文献及び閾値パラメータと共に示す。

【表1】

表 1 - 1

タンパク質 SEQ ID NO	ヌクレオチド SEQ ID NO	クローンID	ライブラリ	断片
1	15	480457	LIVRBCT01	154793R6 (THP1PLB02), 480457H1 (LIVRBCT01), 480457X12R1 (LIVRBCT01), 480457X13R1 (LIVRBCT01), 1817968F6 (PROSNOT20), 3149829R6 (ADREN004), 3766714H1 (BRSTNOT24)
2	16	563663	NEUTLPT01	285464X4 (EOSIHET02), 285464X8 (EOSIHET02), 563663H1 (NEUTLPT01)
3	17	1425842	BEPINON01	120376R6 (MUSCNOT01), 1425842H1 (BEPINON01), 1571293F1 (UTRSNOT05), 1851503F6 (LUNGFEET03), 3596860F6 (FIBPNOT01)
4	18	2349047	COLSUCT01	1718442F6 (BLADNOT06), 1960909R6 (BRSTNOT04), 1960909T6 (BRSTNOT04), 2349047H1 (COLSUCT01), SBHA02478F1, SBHA02364F1, SBHA00749F1
5	19	2415617	HNT3AZT01	471426R6 (MMLR1DT01), 941244R1 (ADREN0T03), 1466986F1 (PANCTUT02), 1519153H1 (BLADTUT04), 2301362R6 (BRSTNOT05), 2415617H1 (HNT3AZT01), 2482778F6 (SMCANOT01), 4410796H1 (MONOTXT01)
6	20	3815186	TONSNOT03	1759852R3 (PITUNOT03), 3815186H1 (TONSNOT03), SBJA02796F1
7	21	5504544	BRABDIR01	046651X31 (CORNNOT01), 179527X7 (PLACNOB01), 905771T1 (COLNNOT08), 1291784F6 (PGANNOT03), 1291784T6 (PGANNOT03), 1542946X14 (PROSTUT04), 2759765R6 (THPIAZS08), 2908366F6 (THYMNOT05), 5504544H1 (BRABDIR01)
8	22	1511326	LUNGNOT14	1511326H1 (LUNGNOT14), 1511326F1 (LUNGNOT14), 1511326T1 (LUNGNOT14), 1511326T6 (LUNGNOT14), 2922438F6 (SININOT04), 3029015H1 (HEARFET02), 5167787H1 (MUSCDMT01)
9	23	1519120	BLADTUT04	1519120H1 (BLADTUT04), 1519120F6 (BLADTUT04), 1519120T6 (BLADTUT04)

【表 2】

表1-2

タンパク質 SEQ ID NO	ヌクレオチド SEQ ID NO	クローンID	ライブラリ	断片
10	24	1673761	BLADNOT05	1673761H1 (BLADNOT05), 1673761F6 (BLADNOT05), 1673761T6 (BLADNOT05), 2024815R6 (KERANOT02), 2111282H1 (BRAITUT03), 2655266F6 (THYMNOT04), 4178671H1 (BRAINOT22), 5307169H1 (MONOTXT02), 1424569T1 (BEPINON01)
11	25	1270442	BRAINOT09	401269R6 (TMLR3DT01), 1270442H1 (BRAINOT09), 1672906F6 (BLADNOT05), 2596974H1 (OVARUT02), 2794801H1 (NPOLNOT01), 3289454H1 (BONRFET01), 3293681H1 (TLXJINT01), 3377437H1 (PENGNOT01), 3744502H1 (THYMNOT08)
12	26	1877133	LEUKNOT03	076555H1 (THPIPEB01), 1422142F6 (KIDNNOT09), 1877133H1 (LEUKNOT03), 2403383F6 (SMCANOT01), 2483377H1 (SMCANOT01)
13	27	2636759	BONTNOT01	2636759F6 (BONTNOT01), 2636759H1 (BONTNOT01), SBUA02427D1
14	28	2716815	THYRNOT09	078565R1 (SYNORAB01), 079174R1 (SYNORAB01), 1272190X14 (TESTTUT02), 1272190X23R1 (TESTTUT02), 1272190X24R1 (TESTTUT02), 2680827H1 (SINIUCT01), 2716815H1 (THYRNOT09), 2716815F6 (THYRNOT09), 3272956H1 (PROSBPT06)

【表3】

表2-1

タンパク質 SEQ ID NO	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコ シル化部位	サイン(signature)配列	相同配列	分析方法
1	482	T160 S4 T211 S217 T313 T430 S52 S67 T140 S146 S201 S217 S224 S258 S275 S378 T467 T472	N57 N184 N353	二重特異性ホスファターゼ 触媒部位: E321-D461	二重特異性タンパク質 チロシンホスファターゼ (ドブネズミ) (g1185552)	BLAST MOTIFS PFAM BLOCKS PRINTS
2	190	T35 T55 S131 S2 S183 Y147	N102	プロテインキナーゼATP 結合部位: L39-K62 プロテインキナーゼ触媒部位: I154-L166 真核性プロテインキナーゼ ドメイン: I33-I186	DRAK2キナーゼ (ヒト) (g3834356)	BLAST MOTIFS PFAM PRINTS
3	455	S252 S89 S234 S258 S268 S302 S342 S346 S364 S429 S434 S61 S96 S302 S410 T414 S415 Y343	N97 N159 N265 N409	プロテインキナーゼATP結合部位: V129-I141 真核性プロテインキナーゼ ドメイン: L16-I257 ロインジツパー L294-L322	セリン/トレオニン プロテインキナーゼZIP (ヒト) (g561543)	BLAST MOTIFS PFAM PRINTS
4	485	S166 S283 S16 T167 S208 S242 T267 S283 T292 S306 T354 S278 T336 T370 S402 T412 S449 S483	N66 N400 N421 N481	プロテインキナーゼ触媒部位: L105-L117 真核性プロテインキナーゼ ドメイン: R26-L247	セリン/トレオニン プロテインキナーゼRICK (ヒト) (g3123887)	BLAST MOTIFS PRINTS PFAM
5	384	T130 T54 S181 T205 S371	N137	ジアシルグリセロールキナーゼ 触媒ドメイン: R16-L153	スフィンゴシンキナーゼ (ハツカネズミ) (g3659694)	BLAST PFAM BLOCKS

【表4】

表2-2

タンパク質 SEQ ID NO	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコ シル化部位	サイン(signature)配列	相同配列	分析方法
6	81	T37 S38 T52 T73 T54		プロテインキナーゼC末端ドメイン: D33-F77	プロテインキナーゼ (ドブネズミ) (g206191)	BLAST PFAM
7	721	S40 S239 S640 T61 S68 S176 S196 S205 T241 S251 T416 T432 T655 T696 S49 T90 S230 T234 T235 S251 T255 T277 T416 S447 S484 S549 T696	N30 N274 N275 N297 N316 N572	プロテインキナーゼATP結合部位: L400-K423 プロテインキナーゼ触媒部位: I513-L525 真核性プロテインキナーゼドメイン: I394-L650 ホルボールエステル/ジアシル グリセロール結合ドメイン: H108-C157	プロテインキナーゼC mu (ヒト) (g438373)	BLAST MOTIFS PFAM PRINTS
8	249	S3 S4 T38 T137 S150 T64 T75 S107 S119 S196	N204	チロシン特異タンパク質 ホスファターゼ活性部位: V88-I100 チロシン特異タンパク質 ホスファターゼ: V88-S98	推定チロシンホスファ ターゼ (ヒト) (g6650693)	MOTIFS BLOCKS BLAST
9	146	S125 S131		真核性プロテインキナーゼドメイン: Y12-L105	mCASK-A (ハツカネズミ) (g3087816)	MOTIFS BLAST PFAM
10	524	T21 T31 S77 S190 S217 S311 S511 S198 S207 T417 S440	N189	真核性プロテインキナーゼドメイン: P247-P492 プロテインキナーゼサイン: L253-K276, L368-L380	プロテインキナーゼ 同族体 (シロイヌナズナ) (g2244835)	MOTIFS BLAST PFAM PRINTS PROFILES/SCAN

【表5】

表2-3

タンパク質 SEQ ID NO	アミノ酸 残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコ シレ化部位	サイン(signature)配列	相同配列	分析方法
11	509	S224 T45 S80 T95 T216 T262 S307 S317 T325 S343 T388 S434 T452 S466 S7 S212 S282	N208	タンパク質ホスファターゼpp2a 調節サブユニット、 代替スプライシング： S56-E462 タンパク質ホスファターゼpp2a 調節サブユニット： S56-V312 EFハンドカルシウム結合ドメイン： D355-L347	タンパク質 ホスファターゼ2A 72 kDa 調節サブユニット (ヒト) (g195222)	MOTIFS BLAST- GenBank BLAST- PRODOM BLAST-DOMO
12	142	S18 T26 T77 T4 T116	N114		TAK1 TGF- β 活性 キナーゼ (ツメガエル) (g3057036)	MOTIFS BLAST- GenBank
13	221	S21 S208 T2 T69 T170 S9 S16		チロシン特異タンパク質 ホスファターゼ活性部位： V146-L158 二重特異性タンパク質 チロシンホスファターゼ： D121-L201 VH-1型二重特異性 ホスファターゼ： E57-V202	チロシン/セリン ホスファターゼ (ヒト) (g181840)	MOTIFS BLAST- GenBank BLAST- PRODOM BLAST-DOMO HMMER-PFAM PROFILES CAN
14	462	T119 S302 S390 S36 S59 S163 T167 T175 S177 T187 S218 S276 T309 S311 S434 T443 S35 S87 S200 T242 S334 S360 T436	N57	チロシンキナーゼ： L139-P427	多ホルモンのに 調整された遺伝子 (ドブネズミ) (g1561667)	MOTIFS BLAST- GenBank BLAST-DOMO

【表6】

表 3 - 1

ヌクレオチド SEQ ID NO	有用な断片	発現組織 (割合)	疾患又は症状 (割合)	ベクター
1 5	435-479	生殖 (0.300) 心血管 (0.150) 造血/免疫 (0.150)	細胞増殖 (0.450) 炎症 (0.500)	PBLUESCRIPT
1 6	219-263	造血/免疫 (0.455) 心血管 (0.182) 発達 (0.091)	細胞増殖 (0.546) 炎症 (0.455)	PBLUESCRIPT
1 7	1191-1235	生殖 (0.250) 心血管 (0.214) 胃腸 (0.214)	細胞増殖 (0.465) 炎症 (0.322)	pT7T3
1 8	542-586 974-1018	胃腸 (0.391) 造血/免疫 (0.174) 生殖 (0.174)	炎症 (0.478) 細胞増殖 (0.391)	pINCY
1 9	217-261 718-761	心血管 (0.256) 生殖 (0.179) 造血/免疫 (0.154)	細胞増殖 (0.564) 炎症 (0.334)	pINCY
2 0	380-424	神経 (0.520) 造血/免疫 (0.240) 生殖 (0.120)	炎症 (0.520) 細胞増殖 (0.400)	pINCY
2 1	487-531 1027-1071	生殖 (0.296) 造血/免疫 (0.198) 胃腸 (0.111)	細胞増殖 (0.568) 炎症 (0.358)	pINCY
2 2	379-423	心血管 (0.267) 胃腸 (0.200) 造血/免疫 (0.200)	炎症 (0.333) 癌 (0.267) 外傷 (0.200)	pINCY
2 3	192-218	神経 (0.500) 泌尿器 (0.500)	癌 (0.500) 細胞株 (0.500)	pINCY

【表7】

表3-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO	有用な断片	発現組織 (割合)	疾患又は症状 (割合)	ペクター
24	163-207	生殖 (0.333) 心血管 (0.133) 皮膚 (0.133)	癌 (0.400) 胎児／細胞株 (0.200) 炎症 (0.133)	pINCY
25	19-63	心血管 (0.182) 造血／免疫 (0.182) 生殖 (0.182)	癌 (0.515) 細胞増殖 (0.242) 炎症 (0.242)	pINCY
26	297-343	心血管 (0.250) 造血／免疫 (0.150) 筋骨格 (0.150)	癌 (0.300) 細胞増殖 (0.250) 炎症 (0.200)	pINCY
27	271-315	内分泌 (0.500) 筋骨格 (0.500)	癌 (0.500)	pINCY
28	161-207	生殖 (0.241) 胃腸 (0.233) 心血管 (0.150)	癌 (0.429) 炎症 (0.263) 細胞増殖 (0.211)	pINCY

【表8】

表4-1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO	ライブラリ	ライブラリの説明
15	LIVRBCT01	LIVRBCT01 ライブラリは、肝臓移植した原発性胆汁性肝硬変患者の肝組織から単離したRNAを用いて作製した。
16	NEUTLPT01	NEUTLPT01 ライブラリは、フィコール-ハイパック比重遠心法によって回収した末梢血顆粒球から単離したRNAを用いて作製した。細胞は、無関係の男女ドナーから得たバフィーコート単位から単離した。細胞は、100 ng/ml 大腸菌 LPS 中で 30 分間培養した。
17	BEPINON01	この規準化された気管支上皮ライブラリは、気管支上皮ライブラリからの 5.12×10^6 個の独立したクローンから作製した。RNA は、54 歳の白人男性から採取した気管支上皮 1 次細胞株から作製した。規準化及びハイブリダイゼーションの条件には Soares ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9228 を採用し、長口の (24 時間) 再アニーリングハイブリダイゼーション時間を用いた。
18	COLSUCT01	COLSUCT01 ライブラリは、70 歳の白人男性から永久回腸フィステル形成を伴なう結腸切除の際に採取した病変 S 状結腸組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、慢性潰瘍性結腸炎を示していた。患者の病歴には、結腸の良性新生物が含まれる。家族歴には、アテローム硬化性冠動脈疾患及び心筋梗塞が含まれる。
19	HNT3AZT01	HNT3AZT01 ライブラリは、(関係付けられた神経性前駆体の性状特性を示すようなヒト奇形癌由来の) hNT2 細胞株から単離した RNA を用いて作製した。細胞は $0.35 \mu\text{M}$ の 5-アザ-2'-デオキシシンチジン (AZ) で 3 日間処理した。
20	TONSNOT03	TONSNOT03 ライブラリは、6 歳の白人男児からアデノイド口蓋扁桃摘出術の際に病変左扁桃組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、左右両側に反応性リンパ組織過形成を示していた。家族歴には、良性高血圧症、心筋梗塞及びアテローム硬化性冠動脈疾患が含まれる。
21	BRABDIR01	BRABDIR01 ライブラリは、脳血管発作で死亡した 57 歳の白人男性の脳から採取した病変小脳組織から単離した RNA を用いて作製した。
22	LUNGNOT14	LUNGNOT14 ライブラリは、47 歳の白人男性の左下葉から肺区域切除の際に採取した肺組織から単離した RNA を用いて作製した。関連腫瘍組織は、病理学的にはグレード 4 腺癌を示しており、実質組織は石灰化肉芽腫性炎を示していた。患者の病歴には、良性高血圧症及び慢性閉塞性肺疾患が含まれる。家族歴には、II 型糖尿病及び急性心筋梗塞が含まれる。

【表9】

表4-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO	ライブラリ	ライブラリの説明
23	BLADTUT04	BLADTUT04 ライブラリは、60歳の白人男性から根治的膀胱切除、前立腺切除及び精管切除の際に採取した膀胱腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、左膀胱壁にグレード3移行性上皮癌を示していた。上皮内癌がドーム及び三角で見つかった。家族歴には、I型糖尿病、胃の悪性新生物、アテローム硬化性冠状動脈疾患及び急性心筋梗塞が含まれる。
24	BLADNOT05	BLADNOT05 ライブラリは、60歳の白人男性から根治的膀胱切除、前立腺切除及び精管切除の際に採取した膀胱組織から単離したRNAを用いて作製した。関連腫瘍組織は、病理学的にはグレード3移行性細胞癌腫を示していた。上皮内癌がドーム及び三角で見つかった。家族歴には、I型糖尿病、胃の悪性新生物、アテローム硬化性冠状動脈疾患及び急性心筋梗塞が含まれる。
25	BRAINOT09	BRAINOT09 ライブラリは、妊娠23週目で死亡した白人男胎児から採取した脳組織から単離したRNAを用いて作製した。
26	LEUKNOT03	LEUKNOT03 ライブラリは、血液型A+型の27歳女性の白血球から単離したRNAを用いて作製した。ドナーは、サイトメガロウイルス（CMV）に対する検査の結果、陰性であった。
27	BONTNOT01	BONTNOT01 ライブラリは、20歳の白人男性から膝上切断を伴う半側下肢切除の際に採取した脛骨骨膜から単離したRNAを用いて作製した。関連腫瘍組織は、病理学的には部分壊死性及び嚢胞性骨芽細胞性グレード3骨肉腫（化学療法後）を示していた。家族歴には、骨形成不全、皮下骨折及びII型糖尿病が含まれる。
28	THYRNOT09	THYRNOT09 ライブラリは、18歳の白人女性から片側甲状腺摘除及び所属リンパ節切除の際に採取した病変甲状腺組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、甲状腺の小胞状腺腫に関連した腺腫様甲状腺腫を示していた。家族歴には、甲状腺癌が含まれる。

【表10】

表5-1

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釈付けに有用である。	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つの機能がある。	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及びPRINTS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、構造的フィンガープ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 に基づいたデータベースに対する問合せ配列を探すアルゴリズム	Krogh, A.ら(1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L.ら(1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322.	個々のタンパク質ファミリーによって、スコア=(PFAM ヒットに) 10-50 ビット

【表11】

表5-2

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.	標準化された質のスコア≧特定の Prosite モチーフのための GCG 指定された「高い」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.	
SPSScan	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キャンするウェ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、編出; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/07277					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C12N15/54	C12N15/55	C12N9/12	C12N9/16	C07K16/18
	C07K16/40	C12Q1/68	A61K38/45	A61K38/46	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
IPC 7 C12N C07K C12Q A61K					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	WO 98 39446 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 11 September 1998 (1998-09-11) abstract page 1, line 1 - page 2, line 8 page 62, line 6 - line 29 page 87, line 10 - page 93, line 25 page 98, line 1 - page 101, line 6 page 365 - page 366 page 381; claims 1,3 -& GCG_GENESEQ_D database, accession number V59579 6 January 1999 "Human secreted protein gene 69 clone HETGJ09" XP002149750 the whole document				10-14
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
12 October 2000			11 JAN 2001		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Fuchs, U		

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/07277

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	TANQUE, T. ET AL.: "Molecular Cloning and Characterization of a Novel Dual Specificity Phosphatase, MKP-5" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 28, 9 July 1999 (1999-07-09), pages 19949-19956, XP002148678 the whole document	1-3,5,6, 8-14
A	--- GROOM, L.A. ET AL.: "Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specific phosphatase" EMBO JOURNAL, vol. 15, no. 14, 15 July 1996 (1996-07-15), pages 3621-3632, XP000925967 the whole document	1-17,20, 23
A	--- WO 99 01541 A (TULARIK INC.) 14 January 1999 (1999-01-14) abstract page 4, line 10 -page 16, line 13 page 17 -page 18; claims 1-11	1-17,20, 23
A	--- WO 99 00507 A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 7 January 1999 (1999-01-07) abstract page 2, line 13 -page 3, line 31 page 38, line 10 -page 46, line 10 page 55 -page 57; claims 1-21	1-17,20, 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/07277**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 and 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

Invention 1

An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: a) an amino acid sequence having the 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, d) an immunogenic fragment of SEQ ID NO: 1; an isolated polynucleotide encoding said polypeptide; a recombinant polynucleotide comprising said polynucleotide; a cell transformed with said recombinant polynucleotide; a transgenic organism comprising said recombinant polynucleotide; a method for producing said polypeptide; an isolated antibody which specifically binds to said polypeptide; an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of: a) a polynucleotide sequence having the SEQ ID NO: 15, b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 90% sequence identity to SEQ ID NO: 15, c) a polynucleotide sequence complementary to a); d) a polynucleotide sequence complementary to b); an RNA equivalent of a)-d); a method for detecting a target polynucleotide in a sample having the sequence of said polynucleotide by hybridizing with a probe; a pharmaceutical composition comprising an effective amount of said polypeptide; a method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional HRIP, comprising administering to a patient said pharmaceutical composition; a method for screening a compound for effectiveness as an agonist or antagonist of said polypeptide; a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a polynucleotide sequence having the SEQ ID NO: 15;

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

Invention 2

Idem as subject 1 but limited to SEQ ID NOS: 2 and 16;

3.-14. Claims: 1-17, 20, 23 partially

Inventions 3-14

Idem as subject 1 but limited to SEQ ID NOS: 3-14 and 17-28.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18, 19, 21 and 22

Claims 18, 19, 21 and 22 refer to an agonist and an antagonist of a polypeptide of claim 1 without giving a true technical characterization. Moreover, no such 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 (Art. 5 and 6 PCT).

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, 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 00/07277

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9839446 A	11-09-1998	AU 6545398 A	22-09-1998
		EP 0972029 A	19-01-2000
		EP 0972030 A	19-01-2000
		WO 9839448 A	11-09-1998
WO 9901541 A	14-01-1999	AU 726294 B	02-11-2000
		AU 8283698 A	25-01-1999
		EP 1005539 A	07-06-2000
WO 9900507 A	07-01-1999	US 5955338 A	21-09-1999
		AU 8269998 A	19-01-1999
		EP 0996733 A	03-05-2000

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	3/10	A 6 1 P	7/06	4 C 0 8 4
	7/04		9/10	4 H 0 4 5
	7/06		11/00	
	9/10		11/06	
	11/00		13/12	
	11/06		17/00	
	13/12		17/06	
	17/00		19/02	
	17/06		19/10	
	19/02		21/00	
	19/10		21/04	
	21/00		25/00	
	21/04			1 0 1
	25/00		25/08	
	1 0 1		25/18	
	25/08		25/22	
	25/18		25/28	
	25/22		27/00	
	25/28		29/00	
	27/00			1 0 1
	29/00		31/10	
	1 0 1		31/12	
	31/10		33/00	
	31/12		35/00	
	33/00		35/02	
	35/00		37/08	
	35/02	C 0 7 K	14/47	
	37/08		16/18	
C 0 7 K	14/47	C 1 2 N	1/15	
	16/18		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/68	A
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
	1/68		33/53	M
G 0 1 N	33/15		37/00	1 0 2
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
	37/00	1 0 2	A 6 1 K	37/54

(31)優先権主張番号 6 0 / 1 4 3 , 1 8 8

(32)優先日 平成11年 7 月 9 日(1999 . 7 . 9)

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(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), AE, 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, ZA, 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 ユエ、ヘンリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・
サニーベイル・ルイスアベニュー 826
- (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
- (72)発明者 ボーグン、マライア・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・
サンレアンドロ・サンティアゴロード 14244
- (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
- (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 オウ・ヤング、ジャニス
アメリカ合衆国カリフォルニア州94005・
プリズペーン・ゴールデンイーグルレーン 233

F ターム(参考) 2G045 AA25 DA12 DA13 DA14 DA36
DA77 FB02 FB07 HA10
4B024 AA01 AA11 BA21 BA43 CA04
DA02 DA06 EA04 GA11 HA01
HA14 HA15
4B063 QA01 QQ43 QR32 QR55 QS34
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CC24
DA01 DA13
4B065 AA90X AA99Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA17 BA15 BA16
BA17 BA18 CA56 MA52 MA55
NA14 ZA012 ZA022 ZA062
ZA162 ZA592 ZA752 ZA892
ZA942 ZA962 ZB072 ZB112
ZB132 ZB152 ZB262 ZB272
ZB312 ZB322 ZB332 ZB352
ZB372 ZC352
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA20
CA40 DA01 DA75 EA22 EA50
FA74

专利名称(译)	用于细胞内磷酸化的调节剂		
公开(公告)号	JP2002538827A	公开(公告)日	2002-11-19
申请号	JP2000605750	申请日	2000-03-17
申请(专利权)人(译)	洞察制药公司		
[标]发明人	バンドマンオルガ タングワイトム ユエヘンリー ヒルマンジェニファーエル ボーグンマライアアール アジムザイヤルダ リュデュングアイナエム オウヤングジャニス		
发明人	バンドマン、オルガ タング、ワイトム ユエ、ヘンリー ヒルマン、ジェニファー・エル ボーグン、マライア・アール アジムザイ、ヤルダ リュ、デュング・アイナ・エム オウ・ヤング、ジャニス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/46 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/00 A61P29 /00 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N9/16 C12N15/09 C12N15/54 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17 /00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/00 A61P29/00 C12N9/1205 C12N9/16 C12N2799/021 C12Y207/01037 C12Y207/11013 C12Y301/03048		
FI分类号	A61K45/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25 /00.101 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31 /10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/54		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045 /FB07 2G045/HA10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063 /QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065 /BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA15 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/CA56 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084 /NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA062 4C084/ZA162 4C084/ZA592 4C084/ZA752 4C084 /ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084		

优先权 60/125593 1999-03-18 US
60/135049 1999-05-20 US
60/143188 1999-07-09 US

摘要(译)

[illegible]