

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 503016

(P2003 - 503016A)

(43)公表日 平成15年1月28日(2003.1.28)

(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 38/00		A 6 1 P 1/00	4 B 0 2 4
45/00		15/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/00		21/00	4 B 0 6 4
15/00		25/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求(全123数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 500658(P2001 - 500658)

(86)(22)出願日 平成12年5月26日(2000.5.26)

(85)翻訳文提出日 平成13年1月25日(2001.1.25)

(86)国際出願番号 PCT/US00/14831

(87)国際公開番号 W000/073334

(87)国際公開日 平成12年12月7日(2000.12.7)

(31)優先権主張番号 60/136,740

(32)優先日 平成11年5月27日(1999.5.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/139,566

(32)優先日 平成11年6月16日(1999.6.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミクス・インコーポレイテッド

アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160

(72)発明者 ユエ、ヘンリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・サニーバイル・ルイスアベニュー 826

(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

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ソーティングネキシン

(57)【要約】

本発明は、ヒトソーティングネキシン(SNEXN)と、それを同定しコードするポリヌクレオチドとを提供する。また、本発明は、発現ベクター及び宿主細胞、抗体、アゴニスト、アンタゴニストを提供する。更に、本発明は、SNEXNの発現に関連する疾患の診断または治療方法、予防方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、

- a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、
- b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、
- c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、
- d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片と、からなるグループから選択されたアミノ酸配列を含む。

【請求項2】 SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む請求項1の単離されたポリペプチド。

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

【請求項4】 請求項2のポリペプチドをコードするある単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 SEQ ID NO:3のポリヌクレオチド配列を含む請求項4の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3のポリヌクレオチドに機能的に結合するプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項6の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項8】 請求項6の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物。

【請求項9】 請求項1のポリペプチドを製造する方法であって、

- a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件の下で細胞を培養する過程であって、前記細胞が組換えポリヌクレオチドで形質転換され、前記組換えポリヌクレオチドが、請求項1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合するプロモーター配列を含む、該過程と、

b) そのように発現するポリペプチドを回収する過程とを含むことを特徴とする請求項1のポリペプチドの製造方法。

【請求項10】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項11】 単離されたポリヌクレオチドであって、

- a) SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択されたポリヌクレオチド配列と、
、
b) SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列と、
c) 前記a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、
d) 前記b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、
e) 前記a)～d)のポリヌクレオチド配列のRNA等価物とを含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項12】 請求項11のポリヌクレオチドの少なくとも60個の連続する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13】 サンプルの標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、前記サンプルが請求項11のポリヌクレオチド配列を有し、

a) 前記サンプルの前記標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を含む少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルとをハイブリダイズする過程であって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチド或いはその断片とでハイブリダイゼーション複合体が形成される条件の下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、該過程と、

b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在の有無を検出する過程であって、存在する場合には随意選択でその量を測定する、該過程とを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドを検出する方法。

【請求項14】 前記プローブが少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 サンプルの標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、前記サンプルが請求項11のポリヌクレオチド配列を有し、

a) PCR法によって、前記標的ポリヌクレオチド或いはその断片を増幅する過程と、

b) 前記増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在の有無を検出する過程であって、存在する場合には随意選択でその量を測定する、該過程とを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドを検出する方法。

【請求項16】 効果的な量の請求項1のポリペプチドと医薬的に容認できる賦形剤とを含む医薬品組成物。

【請求項17】 前記ポリペプチドがSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16の医薬品組成物。

【請求項18】 機能的なSNEYNの発現の低下に関連した疾患やその症状を治療する方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項16の医薬品組成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

【請求項19】 請求項1のポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

- a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に暴露する過程と、
- b) 前記サンプルのアゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項20】 請求項19のスクリーニング方法によって同定されたアゴニスト化合物と医薬的に容認できる賦形剤とを含む医薬品組成物。

【請求項21】 機能的なSNEYNの発現の低下に関連した疾患やその症状を治療する方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項20の医薬品組成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

【請求項22】 請求項1のポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

- a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に暴露する過程と、
- b) 前記サンプルのアンタゴニスト活性を検出する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項23】 請求項22のスクリーニング方法によって同定されたアンタゴニスト化合物と医薬的に容認できる賦形剤とを含む医薬品組成物。

【請求項24】 機能的なSNEYNの過剰な発現に関連した疾患やその症状を治療する方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項23の医薬品組

成物を投与する過程を含むことを特徴とする治療方法。

【請求項25】 請求項1のポリペプチドと特異的に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

a) 好適な条件の下で、請求項1のポリペプチドを少なくとも1つの試験用化合物と結合させる過程と、

b) 請求項1のポリペプチドと前記試験用化合物との結合を検出して、請求項1のポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項26】 請求項1のポリペプチドの活性を変調する化合物をスクリーニングする方法であって、

a) 請求項1のポリペプチドの活性が許容される条件の下で、請求項1のポリペプチドを少なくとも1つの試験用化合物と結合させる過程と、

b) 前記検査用化合物の存在の下で、請求項1のポリペプチドの活性を評価する過程と、

c) 前記試験用化合物の存在の下での請求項1のポリペプチドの活性と、前記試験用化合物の不在のもとでの請求項1のポリペプチドの活性とを比較する過程であって、前記試験用化合物の存在の下での請求項1のポリペプチドの活性の変化が、請求項1のポリペプチドの活性を変調する化合物を示している、該過程とを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項27】 請求項5の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変える効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

a) 前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に暴露する過程と、

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

【請求項28】 SEQ ID NO:4のポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項29】 請求項28のポリヌクレオチドに機能的に結合するプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項30】 請求項29の組換えポリヌクレオチドで形質転換された

細胞。

【請求項31】 請求項29の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物。

【請求項32】 SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチドを製造する方法であって、

a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件の下、請求項30の細胞を培養する過程と、

(b) このようにして発現するポリペプチドを回収する過程とを含むことを特徴とする製造方法。

【請求項33】 請求項28の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変える効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

a) 前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に暴露する過程と、

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

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の技術分野**

本発明は、ソーティングネキシン (sorting nexins) の核酸配列及びアミノ酸配列、並びに癌を含む、免疫異常症及び神経疾患、胃腸障害、遺伝障害、平滑筋異常症、細胞増殖症の診断及び治療、予防におけるこれらの配列の使用に関する。

【0002】**発明の背景**

細胞機構は、最良の構造で最良に機能するように設計されている。細胞が産生する各分子は、好適な細胞部位に輸送されなければならない。適正に局在化するように、各分子は、細胞のアドレス情報を含んでいなければならない。ソーティングネキシンタンパク質のファミリーを含む輸送機構は、この情報を利用して分子を目的の部位に正確に輸送する。これは、ダイナミックなプロセスであり、分子の位置は時間によって変わる。分子の適正な局在化を含む任意のステップの異常は、糖尿病やアルツハイマー病などの疾患につながり得る (James, D.E. 及び R.C. Piper (1994) J. Cell Biol. 126:1123-1126; Nordstedt, C. 他 (1993) J. Biol. Chem. 268:608-612)。

【0003】

この情報によって、タンパク質の一次構造内の標的部位のアドレスが与えられる。或るアミノ酸配列は、分子のプロセッシングまたは再利用の間、「輸送コード」として働き、分子を正確に局在化させる。幾つかのモチーフが同定された。2つの主なモチーフは、核局在化シグナルとシグナルペプチドである。核局在化シグナル (NLS) は、塩基性残基が多いアミノ酸の短い配列からなる。NLSは、糖質コルチコイド受容体などの核に輸送されるタンパク質に見られる。NLSは、NLS受容体である importin によって認識されて、単量体GTP結合タンパク質Ranと相互作用する。このNLSタンパク質 / 受容体 / Ranの複合体は、ホモ二量体タンパク質である核輸送因子2 (NTF2) の助けを借りて核細孔に導かれる。NTF2は、GDP結合型のRan及びp62などの核細孔複合体である多数のタンパク質と結合する。

【0004】

シグナルペプチドは、小胞体（ER）に輸送されるタンパク質に見られる。シグナルペプチドは、疎水性塩基が多いアミノ酸の短い配列からなる。通常、シグナルペプチドは、タンパク質のN末端の端部に見られ、サイトゾルシグナル認識ペプチド（SRP）によって認識される。このSRPはシグナルペプチドに結合し、ERの内在性膜タンパク質であるSRP受容体と結合する。SRP受容体と結合すると、シグナルペプチドを含む新規に産生されたタンパク質は、ER膜を通過して輸送される。シグナルペプチドを含むタンパク質は、脂質二重層の中に導入され、細胞小器官の管腔に輸送されるか、或いは細胞外に分泌される。

【0005】

タンパク質もまた、細胞内の或る部位に保持されるか、或いは輸送されるかを指定する別々のモチーフを含む。例えば、トランスゴルジ網内在性膜タンパク質 TGN38は、トランスゴルジ網と細胞膜との間を行き来する。TGN38は、2つの異なったモチーフを含む。細胞質尾部内にある1番目のモチーフは、ゴルジ体への輸送に關与する。疎水性膜貫通領域内にある2番目のモチーフは、タンパク質をTGN内に保持する役割を果たす（Stephens, D.J. 他（1997）*J. Biol. Chem.* 272:14104-14109）。モチーフの修飾は、タンパク質のアドレスを変え、タンパク質を別の部位に局在化させる。例えば、上皮細胞成長因子（EGF）受容体及びT細胞受容体（TCR）などの細胞膜受容体は、受容体にリガンドが結合するとリン酸化する標的モチーフを含む。標的モチーフのリン酸化によって、内部移行し、受容体がリソソームに輸送されて分解される（Dietrich, J. 他（1994）*EMBO J.* 13:2156-2166）。

【0006】

アミノ酸モチーフによる情報は、輸送機構が利用して、タンパク質を選別して小胞内に包装し、適正な部位に輸送する。例えば、膜上のクラスリンを集めての小胞の形成をトリガするアダプタータンパク質（AP）複合体が、細胞内の各部位へタンパク質を輸送するためのタンパク質の選別に関与する。ゴルジ体で形成されるAP-1小胞は、陽イオン依存性及び陽イオン非依存性マンノース-6-リン酸受容体（MPR）を含む。これらの小胞は、リソソームに運ばれる。細胞膜で形成さ

れるAP-2小胞は、TGN38含有小胞 (Stephens, 前出) とリガンド結合TCR含有小胞 (Dietrich, 前出) とを含む。TGN38含有小胞はTGNに輸送され、TCR含有小胞はリソソームに輸送される。

【0007】

標的モチーフを含む分子が選別されて小胞内に包装されると、その小胞は適正な部位に輸送されなければならない。この輸送プロセスには、別の一連のタンパク質が関与する。GTP加水分解酵素のRabファミリーは、明確でないある機構によって、このプロセスに関与する。それぞれが特定の細胞小器官に付随する、幾つかのRabタンパク質が示されている。例えば、Rab3は細胞膜に付随し、Rab4はソーティングエンドソームに付随し、Rab11は再利用エンドソームに付随する。また、細胞型や機能に特異的なRabもある。例えば、Rab3Aは、刺激を受けた神経細胞のシナプス小胞開口分泌に関与し、Rab4bは、インシュリン刺激を受けた脂肪細胞のグルコース輸送体 - 4 (GluT4) の転位置に関与する (James, D.E. 及び R.C. Piper (1994) J. Cell Biol. 126:1123-1126)。

【0008】

ソーティングネキシンは、特定のタンパク質を適正な細胞内部位へ確実に運搬させるタンパク質のファミリーであり、細胞膜に部分的に付随する親水性分子である (Haft, C.R. 他 (1998) Mol. Cell. Biol. 18:7278-7287)。ソーティングネキシンは、PhoX相同PX)ドメインとして知られる保存されたドメインを含む (Ponting, C.P. (1996) Protein Sci. 5:2353-2357)。ソーティングネキシンのファミリーの中には、様々な受容体分子に付随するものがあり、これらのネキシンが、細胞小器官間の受容体運搬に関与していることを示唆している (Haft, 前出)。ソーティングネキシン5が、ファンコニー貧血相補性グループAタンパク質と結合する (Otsuki, T. 他 (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 265:630-635)。

【0009】

ソーティングネキシン - 1 (SNX1) が、リソソーム標的モチーフの認識に関与する。このソーティングネキシンは、もとは*Saccharomyces cerevisiae* Mvp1に相同であると同定された。この*Saccharomyces cerevisiae* Mvp1は、タンパク質

を細胞表面に輸送するか或いはそれとは離れた液胞に局在化するかのタンパク質の選別に関与するタンパク質である (Ekena, K. 及び Stevens, T.H. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15:1671-1678; Kurten, R.C.他 (1996) *Science* 272:1008-1010)。SNX1を必要とするリソソームに輸送される分子には、カルボキシペプチダーゼYソーティング受容体とEGF受容体が含まれる。SNX1が存在しないと、これらの分子は誤った部位に局在する (Kurten, 前出; Horazdovsky, B.F. 他 (1997) *Mol. Biol. Cell* 8:1529-1541)。SNX1に相同な*Saccharomyces cerevisiae* Vps5は、カルボキシペプチダーゼYソーティング受容体Vps10を含む特定のタンパク質のゴルジ体への局在化に関与する。Vps5ヌル変異体は、血管形態の欠陥を示す (Horazdovsky, 前出; Nothwehr, S.F. 及び A.E. Hindes (1997) *J. Cell Sci.* 110:1063-1072)。

【0010】

ソーティングネキシンに見られるPXドメインが、NADPH酸化酵素のPhoX成分及びフォスファチジルイノシトール3キナーゼのCpkクラスを含む、様々な別のタンパク質にも見られる。殆どのPXドメインは、SH3ドメイン結合タンパク質の特徴であるポリプロリンモチーフを含む (Ponting, 前出)。NADPH酸化酵素のPhoX成分を伴うSH3ドメイン仲介相互作用は、NADPH酸化酵素多タンパク質複合体の形成に一定の役割を果たしている (Leto, T.L. 他 (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10650-10654; Wilson, L. 他 (1997) *Inflamm. Res.* 46:265-271)。PXドメインは、タンパク質間の相互作用を促進するための専用ドメインの一例に過ぎない。タンパク質間の相互作用ドメインの他の例を以下に記載する。

【0011】

SH3ドメインは、ある細胞質プロテインチロシンキナーゼであるプロトオンコジーンc-Srcのある領域に相同である。SH3は、プロラインの豊富なポリペプチドリガンドと相互作用する50～60個のアミノ酸からなる小さなドメインである。SH3ドメインは、シグナル伝達及び細胞の局在化、膜と細胞骨格の相互作用に関与する真核生物の様々なタンパク質にみられる。ある場合には、SH3ドメイン含有タンパク質は、受容体チロシンキナーゼと直接相互作用する。SH3の構造は

、互いに直角に折り畳まれた2つの平行でないシートからなる。この折り畳み構造は、異なったSH3ドメイン間に高度に保存された残基と一列になった疎水ポケットを形成する。このポケットによって、ポリペプチドリガンドのプロライン残基との極めて重要な疎水接触が起こる (Feng, S. 他 (1994) Science 266: 1241-1247)。

【0012】

WWドメインと呼ばれる新規のドメインは、プロラインの多いリガンドと結合するという点でSH3ドメインに類似している。このドメインは、デュシェンヌ型筋ジストロフィに直接関与する細胞骨格タンパク質であるジストロフィンで初めて見つかった (Bork, P. 及び M. Sudol (1994) Trends Biochem. Sci. 19:531-533)。その後、WWドメインは、発達及び細胞分化、細胞増殖に関与する様々な細胞内シグナル伝達分子で見つかった。WWドメインの構造は、一般にトリプトファンである4つの保存された芳香族塩基がまわりに集まった複数の鎖からなる。

【0013】

SH3同様に、SH2ドメインもc-Srのある領域に相同である。SH2ドメインは、ホスチロシンと直接相互作用して、受容体チロシンキナーゼ性シグナル伝達の調節及び伝達の即時型の機構を形成する。例えば、異なった10個ものSH2ドメインが、活性化されたPDGF受容体のリン酸化されたチロシン残基に結合できるため、リガンド性受容体活性に対する高度に協調し、かつ同調した応答が可能となる (Reviewed in Schaffhausen, B. (1995) Blochim. Biophys. Acta. 1242:61-75.)。

【0014】

プレクストリン相同ドメイン (PHD) が、血小板のプロテインキナーゼCの主な基質であるプレクストリンで初めに同定された。その後、このドメインは、細胞内シグナル伝達または細胞骨格機構に関与する90以上のタンパク質で見つかった。プレクストリン相同ドメインを含むタンパク質には、様々なキナーゼ類及びホスホリパーゼCアイソフォーム、グアニンヌクレオチド遊離因子、GTP加水分解酵素活性タンパク質が含まれる。多くのPHDタンパク質は、細胞膜に結合して機能する。この結合は、PHD自体が行うと思われる。それぞれのPHDは、両親媒

性のヘリックスに隣接する2つの平行でないシートからなる共通構造をもつ。構成鎖を連結する可変ループが、通常は正に帯電した環境において生じ、リガンド結合部位として機能し得る (Lemmon, M.A. 他 (1996) Cell 85:621-624)。

【0015】

アンキリン (ANK) 反復が、様々な細胞内シグナル伝達機能に付随するタンパク質間の相互作用を仲介する。例えば、ANK反復は、キナーゼ及びキナーゼインヒビター、腫瘍抑制因子、細胞周期調節タンパク質などの細胞増殖に關与するタンパク質に見られる (例えば、Kalus, W. 他 (1997) FEBS Lett. 401:127-132; Ferrante, A.W. 他 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1911-1915.を参照)。一般にこれらのタンパク質は、それぞれが約33個のアミノ酸からなる多数のANK反復を含む。myotrophinは、心肥大の発達に重要な役割を果たすANK反復タンパク質であり、多くの心臓病に寄与する因子である。他のANK反復と同様に、myotrophin ANK反復の構造は、それぞれが突出した「先端部」の後にヘリックス-ターン-ヘリックスコアを有する。これらの先端部は可変配列であり、タンパク質間の相互作用に一定の役割を果たし得る。ANK反復のヘリックス-ターン-ヘリックスは互いに積み重なり、疎水性相互作用によって安定化する (Yang, Y. 他 (1998) Structure 6:619-626)。

【0016】

新規のソーティングネキシン及びそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、癌を含む、免疫異常症及び神経疾患、胃腸障害、遺伝障害、平滑筋異常症、細胞増殖症の診断及び治療、予防に有用な新規の組成物を提供することで当分野のニーズに答えることができる。

【0017】

発明の要約

本発明は、個別にはそれぞれ「SNEYN-1」、「SNEYN-2」、総称して「SNEYN」と呼ぶソーティングネキシンである実質的に精製されたポリペプチドを提供する。本発明の一実施態様では、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、

c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含む単離したポリペプチドを提供する。別法では、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む単離したポリペプチドを提供する。

【0018】

本発明は、更に、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離したポリヌクレオチドを提供する。ある別法では、SEQ ID NO:1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。更なる別法では、SEQ ID NO:3のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0019】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合するプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。ある別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。更なる別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物を含む。

【0020】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの製造方法を提供する。この方法は、a) ポリペプチドの発現に好適な条件下、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合するプ

ロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養する過程と、(b)このようにして発現するポリペプチドを回収する過程とを含む。

【0021】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する単離した抗体を提供する。

【0022】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択されたポリヌクレオチド配列と、b) SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択されたポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列と、c) a) に相補的なポリヌクレオチド配列と、d) b) に相補的なポリヌクレオチド配列と、e) a) - d) のRNA等価物とからなるグループから選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離したポリヌクレオチドを提供する。別法では、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

【0023】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択されたポリヌクレオチド配列と、b) SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択されたポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列と、c) 前記a) に相補的なポリヌクレオチド配列と、d) b) に相補的なポリヌクレオチド配列と、e) 前記a) - d) のRNA等価物とからなるグループから選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有するサンプルの標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。この方法は、a) 前記サンプル内の標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を含む少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルをハイブリダイズさせる過程であって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片とでハイブリダイゼーション複合体が形成される条件の下、前記プローブが特異的に前記標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする、該過程と、b) 前記ハイブリダイゼーション複合体

の存在の有無を検出し、存在する場合には随意選択でその量を測定する過程とを含む。別法では、前記プローブは、60個以上の連続するヌクレオチドを含む。

【0024】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択されたポリヌクレオチド配列と、b) SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択されたポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列と、c) 前記a) に相補的なポリヌクレオチド配列と、d) 前記b) に相補的なポリヌクレオチド配列と、e) 前記a) - d) のRNA等価物とからなるグループから選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有するサンプルの標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。この方法は、a) PCR法によって、前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、b) 前記増幅された標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在の有無を検出し、存在する場合には随意選択でその量を測定する過程とを含む。

【0025】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを効果的な量含む医薬品組成物と、好適な医薬用賦形剤を提供する。ある別法では、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む医薬品組成物を提供する。更に、本発明は、機能的なSNEYNの発現の低下に関連した疾患やその症状を治療する方法であって、そのような治療が必要な患者にこの医薬品組成物を投与する過程を含む。

【0026】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する

。この方法は、a) 前記ポリペプチドを含むサンプルを化合物に暴露する過程と、b) 前記サンプルのアゴニスト活性を検出する過程とを含む。ある別法では、本発明は、前記方法によって同定されたアゴニスト化合物及び好適な医薬用賦形剤を含む医薬品組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的なSNEYNの発現の低下に関連した疾患やその症状を治療する方法であって、そのような治療が必要な患者にこの医薬品組成物を投与する過程を含む。

【0027】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、a) 前記ポリペプチドを含むサンプルを化合物に暴露する過程と、b) 前記サンプルのアンタゴニスト活性を検出する過程とを含む。ある別法では、本発明は、前記方法によって同定されたアンタゴニスト化合物及び好適な医薬用賦形剤を含む医薬品組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、機能的なSNEYNの過剰な発現に関連した疾患やその症状を治療する方法であって、そのような治療が必要な患者にこの医薬品組成物を投与する過程を含む。

【0028】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。この方法は、a) 好適な条件のもとで、前記ポリペプチドを少なくとも1つの試験用化合物と結合させる過程と、b) 前記試験用化合物と前記ポリペプチドの結合を検出して、前記ポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定する過程とを含む。

【0029】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と、b) SEQ ID NO:1のアミノ

酸配列と90%以上の配列同一性を有する自然発生のアミノ酸配列と、c) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、d) SEQ ID NO:1のアミノ酸配列の免疫原性断片とからなるグループから選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの活性を変調する化合物のスクリーニング方法を提供する。この方法は、a) 前記ポリペプチドの活性が許容される好適な条件のもとで、前記ポリペプチドを少なくとも1つの試験用化合物と結合させる過程と、b) 前記試験用化合物の存在のもとで、前記ポリペプチドの活性を評価する過程と、c) 前記試験用化合物の存在のもとでの前記ポリペプチドの活性と、前記試験用化合物の不在のもとでの前記ポリペプチドの活性とを比較する過程であって、前記試験用化合物の存在のもとでの前記ポリペプチドの活性の変化が、前記ポリペプチドの活性を変調する化合物を示している、該過程とを含む。

【0030】

更に本発明は、標的ポリヌクレオチドの発現を変える効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、前記標的ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択された配列を含み、a) 前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に暴露する過程と、b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出する過程とを含む。

【0031】

更に本発明は、SEQ ID NO:4のポリヌクレオチド配列を含む単離したポリヌクレオチドを提供する。更に、本発明は、SEQ ID NO:4のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと機能的に結合するプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。ある別法では、組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。更なる別法では、前記組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物を提供する。

【0032】

更に本発明は、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含むポリペプチドを製造する方法を提供する。この方法は、a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件の下、SEQ ID NO:4のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドに機能的に結合するプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養す

る過程と、(b)このようにして発現するポリペプチドを回収する過程とを含む。

【0033】

本発明の記載について

本発明のタンパク質及び核酸配列、方法について説明する前に、本発明は、ここに開示した特定の装置及び材料、方法に限定されず、その実施形態を変更できることを理解されたい。また、ここで用いられる用語は、特定の実施例のみを説明する目的で用いられたものであり、後述の請求の範囲によってのみ限定され、本発明の範囲を限定することを意図したものではないということも理解されたい。

【0034】

本明細書及び請求の範囲において単数形を表す「或る」、「その(この等)」は、文脈で明確に示していない場合は複数形を含むことに注意されたい。従って、例えば「或る宿主細胞」は複数の宿主細胞を含み、その「抗体」は複数の抗体は含まれ、当業者には周知の等価物なども含まれる。

【0035】

本明細書で用いた全ての科学技術用語は、別の方法で定義されていない限り、本発明の属する技術分野の一般的な技術者が普通に解釈する意味と同じである。本明細書で記述したものと類似、或いは同等の全ての装置及び材料、方法は本発明の実施及びテストに使用できるが、好適な装置及び材料、方法をここに記す。本明細書に記載の全ての文献は、本発明に関連して使用する可能性のある文献に記載された細胞系、プロトコル、試薬、ベクターを記述し開示するために引用した。従来の発明を引用したからと言って、本発明の新規性が損なわれると解釈されるものではない。

【0036】

定義

本明細書において「SNEYN」とは、天然、合成、半合成或いは組換え体など全ての種(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)から得られる実質的に精製されたSNEYNのアミノ酸配列のことである。

【0037】

本明細書において「アゴニスト」とは、SNEXNの生物学的活性を強化したり、模倣する分子のことである。このアゴニストは、SNEXNに直接相互作用するか、或いはSNEXNの関与する生物学的経路の成分と作用することで、SNEXNの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

【0038】

本明細書において、「アレル変異配列」とは、SNEXNをコードする遺伝子の別の形である。アレル変異配列は、核酸配列における少なくとも1つの変異によって生じ、変異mRNA若しくは変異ポリペプチドになり、これらの構造や機能は変わる場合もあれば変わらない場合もある。ある遺伝子は、自然発生型のアレル変異配列が存在しないもの、1つ或いは多数存在するものがある。一般にアレル変異配列を生じる変異は、ヌクレオチドの自然な欠失、付加、或いは置換による。これらの各変異は、単独或いは他の変異と同時に起こり、所定の配列内で一回或いはそれ以上生じる。

【0039】

本明細書において、SNEXNをコードする「変異」核酸配列とは、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、SNEXNと同じポリペプチド或いはSNEXNの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドのことである。この定義には、SNEXNをコードするポリヌクレオチド配列の正常の染色体の遺伝子座ではない位置でアレル変異配列と不適當或いは予期せずハイブリダイゼーション、及びSNEXNをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、容易に検出可能な或いは検出困難な多形性を含む。コードされたタンパク質も変異され得り、サイレント変化を生じSNEXNと機能的に等価となるアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にSNEXNの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性についての類似性に基いて成され得る。たとえば、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリシン及びアルギニンが含まれ得る。類

似の親水性の値をもち極性非荷電側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニンが含まれ得る。類似の親水性の値をもち非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、フェニルアラニン及びチロシンが含まれ得る。

【0040】

本明細書において「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」とは、オリゴペプチドまたはペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、或いはそれらの任意の断片であり、天然の分子または合成された分子である。「アミノ酸配列」が自然発生のタンパク質分子である場合、アミノ酸配列及び類似の用語は、アミノ酸配列を、記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0041】

本明細書において用語「増幅」とは、核酸配列の付加的な複製を生成することに関連する。一般にはこの技術分野では周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて行われる。

【0042】

本明細書において、「アンタゴニスト」とは、SNEYNの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストは、SNEYNに直接相互作用するか、或いはSNEYNの関与する生物学的経路の成分と作用することで、SNEYNの活性を変調する抗体、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。

【0043】

本明細書において「抗体」とは、Fab及びF(ab')₂、及びそれらの断片、Fv断片などの無傷の分子であり、抗原決定基と結合可能である。SNEYNポリペプチドと結合する抗体は、抗体を免疫する目的の小ペプチドを含む無傷の分子またはその断片を用いて調整可能である。動物(例えば、マウス、ラット、若しくはウサギ)を免疫化するのに使用されるポリペプチド或いはオリゴペプチドは、RNAの翻訳から引き出されたり化学的に合成され得り、必要に応じて担体プロテインと結合することも可能である。ペプチドと化学的に結合した一般に用いられる

担体は、ウシ血清アルブミン、チログロビン、及びキーホールリンペットヘモニアン (KLH) を含む。次に、この結合したペプチドを用いて動物を免疫化する。

【0044】

本明細書において「抗原決定基」とは、特定の抗体と接触する分子の領域（即ちエピトープ）である。タンパク質或いはタンパク質の断片が、宿主動物を免疫化するのに用いられるとき、このタンパク質の種々の領域は、抗原決定基（タンパク質上の特定の領域或いは三次元構造体）に特異的に結合する抗体の産生を誘発し得る。抗原決定基は、抗体と結合するために無傷の抗原（即ち、免疫応答を引き出すために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0045】

本明細書において「アンチセンス」とは、特定の核酸配列のセンス鎖と塩基対を形成し得る任意の組成物である。アンチセンス成分には、DNAと、RNAと、ペプチド核酸（PNA）、ホスホロチオネートやメチルホスホネート、ベンジルホスホネート（benzylphosphonate）などの修飾された骨格連鎖（backbone linkage）を有するオリゴヌクレオチドと、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖、2'-benzylphosphonateなどの修飾された糖基（sugar group）を有するオリゴヌクレオチドと、5-メチルシトシンまたは2'-deoxyuracil、7-deaza-2'-deoxyguanosineなどの修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アンチセンス分子は、化学合成や転写を含む任意の方法で作ることができる。相補的アンチセンス分子は、一度細胞に導入されると、細胞によって作られた自然発生の核酸配列と塩基対となって二重鎖を形成し、転写や翻訳を阻害する。「負」または「マイナス」という表現はアンチセンス鎖であり、「正」または「プラス」という表現はセンス鎖である。

【0046】

本明細書において「生物学的活性」とは、自然発生分子の構造的、調節的、或いは生化学的機能を有するタンパク質のことである。同様に、「免疫学的に活性」または「免疫原性」とは、天然或いは組換え体のSNEYN、合成のSNEYNまたはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物或いは細胞の特定の免疫応答を誘発

して特定の抗体と結合する能力のことである。

【0047】

本明細書において「相補的」とは、2つの一本鎖核酸配列が塩基対形成によってアニールする関係にあることである。例えば、配列5'-AGT-3'は相補的な配列5'-TCA-3'と塩基対を形成する。

【0048】

本明細書において「所定のポリヌクレオチド配列を含む組成物」または「所定のアミノ酸配列を含む組成物」とは広い意味で、所定のヌクレオチド配列或いはアミノ酸配列を含む任意の組成物のことである。この組成物は、乾燥した製剤或いは水溶液、無菌組成物を含み得る。SNEYN若しくはSNEYNの断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このプローブは、凍結乾燥状態で保存可能であり、糖質などの安定化剤と結合可能である。ハイブリダイゼーションにおいて、プローブは、塩（例えば、NaCl）及び界面活性剤（例えば、SDS：ドデシル硫酸ナトリウム）、その他の物質（例えば、デンハート液、乾燥ミルク、サケ精子DNA等）を含む水溶液に展開され得る。

【0049】

本明細書において「コンセンサス配列」とは、不要な塩基を分離するためにDNA配列分析が繰り返された核酸配列であって、XL-PCRキット（PE Biosystems, Foster City CA）を用いて5'及び/または3'の方向に延長されて再配列された核酸配列、或いはGELVIEW断片構築システム（GCG, Madison, WI）またはPhrap（University of Washington, Seattle WA）などのフラグメントの構築のためのコンピュータプログラムを用いて、cDNAまたはEST、遺伝子DNA断片を1回或いはそれ以上重複して構築された核酸配列のことである。延長及び構築の両方によってコンセンサス配列に構築されるものもある。

【0050】

本明細書において「保存的なアミノ酸置換」とは、元のタンパク質の特性を殆ど変えないと推定される置換のことである。即ち、置換によってそのタンパク質の構造や機能が大きくは変わらず、そのタンパク質の構造、特にその機能が保存

される。以下に、あるタンパク質の元のアミノ酸が別のアミノ酸に置換された保存的なアミノ酸置換を示す。

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

【0051】

一般に、保存されたアミノ酸置換では、(a) 置換された領域のポリペプチドの骨格構造、例えば、シートやヘリックス構造、(b) 置換された部位の分子の電荷または疎水性、及び/または(c) 側鎖の大半が維持される。

【0052】

本明細書において「欠失」とは、1個以上のアミノ酸残基若しくは核酸残基が欠如するアミノ酸配列若しくは核酸配列の変化である。

【0053】

本明細書において「誘導体」とは、化学修飾されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。ポリヌクレオチド配列の化学修飾には、例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基、或いはアミノ基による水素の置換がある。誘導体ポリヌクレオチドは、自然分子（未修飾の分子）の生物学的或いは免疫学的機能を少なくとも1つ保持するポリペプチドをコードする。誘導体ポリペプチドとは、もとのポリペプチドの生物学的機能、或いは免疫学的機能を少なくとも1つ保持する、グリコシル化、ポリエチレングリコール化、或いは任意の同様のプロセスによって修飾されたものである。

【0054】

本明細書において「検出可能な標識」とは、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合或いは非共有結合で結合する、測定可能なシグナルを発生し得るレポーター分子及び酵素のことである。

【0055】

本明細書において「断片」とは、SNEXNまたはSNEXNをコードするポリヌクレオチドのある部分であって、その親配列（parent sequence）と同一であるがその配列より長さが短い。ある断片の最大の長さは、親配列から1つのヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さとなる。例えば、ある断片は、5～1000個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基から形成される。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子、またはその他の目的に用いるある断片は、少なくとも5または10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250、500個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さである。断片は、分子の特定の領域から優先的に選択される場合もある。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示された最初の250または500のアミノ酸（或いは、ポリペプチドの最初の25%または50%）から選択された連続するアミノ酸の一定の長さを含み得る。これらの長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の任意の長さが、本発明の実施例に含まれ得る。

【0056】

SEQ ID NO:3 - 4のある断片は、例えば、その断片を得たゲノムの別の配列全てと異なるような、SEQ ID NO:3 - 4を特異的に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含み得る。SEQ ID NO:3 - 4のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅技術、或いはSEQ ID NO:3 - 4を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:3 - 4の正確な断片の長さや領域は、その断片の所期の目的に基づいた当分野では一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0057】

SEQ ID NO:1 - 2のある断片は、SEQ ID NO:3 - 4のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1 - 2のある断片は、特異的にSEQ ID NO:1 - 2を同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO:1 - 2のある断片は、特異的にSEQ ID NO:1 - 2を認識する抗体の産生のための免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:1 - 2の正確な断片の長さや領域は、その断片の所期の目的に基づいた当分野では一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0058】

本明細書において「完全長」のポリヌクレオチド配列とは、少なくともある翻訳開始コドン（例えば、メチオニン）を含み、その後翻訳領域と翻訳停止コドンが続く。「完全長」のポリヌクレオチド配列は、「完全長」のポリペプチド配列をコードする。

【0059】

本明細書において「相同」とは、2つ以上のポリヌクレオチド配列間、若しくは2つ以上のポリペプチド配列間の配列の類似性または可換性、同一性のことである。

【0060】

本明細書において、ポリヌクレオチド配列に用いられる「パーセント同一性」又は「%同一性」とは、標準化アルゴリズムを用いてアラインされる、2つ以上のポリヌクレオチド配列間の一致する残基の百分率のことである。このようなアルゴリズムは、標準化された再現できる方法で、2つの配列間のアラインメントを最適化するべく、配列にギャップを挿入して、より意味のある2つの配列間の

比較を行うことができる。

【0061】

ポリヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。このプログラムは、分子生物学分析プログラム一式 (DNASTAR, Madison WI) であるLASERGENEソフトウェアパッケージの一部である。CLUSTAL Vが、Higgins, D.G. 及び P.M. Sharp (1989) CAB IOS 5:151-153、Higgins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対のアライメントの場合、デフォルトパラメーターは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。「重み付けされた」残基重み付け表が、デフォルトとして選択された。パーセント同一性は、「パーセント類似性」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0062】

別法では、一般に用いられ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式が、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)によって提供されており、NCBI、Bethesda, MD、及びインターネット (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) などから入手できる。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列を様々なデータベースからの別のポリヌクレオチド配列にアラインさせるのに用いられる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールが入手可能であり、2つのヌクレオチド配列の対を直接比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>にアクセスして、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp (以下に記載) の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、デフォルト設定のギャップ及び他のパラメーターで用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較する場合、ある者は、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (April-21-2000)を用いてblastnを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、

以下のようにする。

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

パーセント同一性は、例えば、特定の配列番号で決められた、所定の配列の全体の長さに対して測定してもよいし、短い長さに対して、例えば、ある大きな所定の配列から得られた断片、例えば、連続する少なくとも、20または30、40、50、70、100、200のヌクレオチドの断片の長さに対して測定してもよい。このような長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の配列の任意の長さの断片が、パーセント同一性が測定されるある長さを示すときに用いられる。

【0063】

高い同一性を示さない核酸配列でも、遺伝子コードの縮重のために、類似のアミノ酸配列をコードし得る。縮重によって核酸配列を変化させて、それぞれが実質的に同じタンパク質をコードする多数の核酸配列を作ることができる。

【0064】

本明細書において、ポリペプチド配列に用いられる「パーセント同一性」又は「%同一性」とは、標準化アルゴリズムを用いてアラインされる、2つ以上のポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は周知である。アラインメント方法の中には、保存的なアミノ酸置換を考慮したものもある。このような上記した保存的な置換は、一般に、置換部位の電荷や疎水性が保存され、ポリペプチドの構造（従って機能も）が保存される。

【0065】

ポリペプチド配列間のパーセント同一性は、MEGALIGN version 3.12e配列アライメントプログラム(上記)に組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて測定可能である。対方式のポリペプチド配列のアライメントの場合、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。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択された。ポリヌクレオチドアライメントと同様に、パーセント同一性は、「パーセント類似性」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0066】

別法では、NCBI BLAST一式が用いられる。例えば、2つのポリペプチド配列を対方式で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (April-21-2000)を用いてblastpを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

パーセント同一性は、例えば、特定の配列番号で決められた、所定のポリペプチド配列の全体の長さに対して測定してもよいし、短い長さに対して、例えば、ある大きな所定のポリペプチド配列から得られた断片、例えば、連続する少なくとも15、20または30、40、50、70、150の残基の断片の長さに対して測定してもよい。このような長さは単なる例であり、配列表及び表、図面を含む明細書に記載の配列の任意の長さの断片が、パーセント同一性が測定されるある長さを示すときに用いられる。

【0067】

本明細書において「ヒト人工染色体(HAC)」は直鎖状の微小染色体であり、6Kb~10MbのサイズのDNA配列を含み得り、染色体の複製及び分離、

維持に必要な全ての要素を含む。

【0068】

本明細書において「ヒト化抗体」とは、もとの結合能力を保持しつつよりヒトの抗体に似せるために、非抗原結合領域のアミノ酸配列が変異された抗体分子である。

【0069】

本明細書において「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件の下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成して結合するプロセスである。特定のハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相補性を有することを示す。アニーリングが許容される条件の下で、特定のハイブリダイゼーション複合体が形成され、洗浄過程の後もハイブリダイズしたままである。洗浄過程は、ハイブリダイゼーションプロセスの厳密性において特に重要であり、より厳密な条件では、非特異的な結合、即ち完全には一致しない核酸両鎖の対の間の結合が減少する。核酸配列のアニーリングが許容される条件は、当業者によって日常的に決定され、ハイブリダイゼーションの実験中一定であるが、洗浄過程は、実験中に変更して目的の厳密性にする事が可能であり、即ちハイブリダイゼーション特異性が得られる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度68、6×SSC、約1% (w/v) のSDS、約100 μg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0070】

一般に、ハイブリダイゼーションの厳密性は、洗浄過程を行う温度で部分的に表すことができる。この洗浄温度は通常、所定のイオン強度とpHにおける特定の配列の熱融解点(T_m)より低い、約5～20に選択される。このT_mは、(所定のイオン強度とpHの下) 標的の配列の50%が完全に一致するプローブとハイブリダイズする温度である。核酸のハイブリダイゼーションのために、T_m及び条件を計算する式は、周知であり、Sambrook, J. 他による、1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; 特に volume 2, chapter 9.に記載されている。

【0071】

本発明のポリヌクレオチド間のハイブリダイゼーションの高い厳密性は、約0.2 × SSC及び約1%のSDSの存在の下での約68 °Cで1時間の洗浄過程を含む。別法では、65 °C、60 °C、55 °C、42 °Cの温度で行う。SSCの濃度は、0.1%のSDSが存在の下、0.1 ~ 2 × SSCの範囲である。通常は、遮断剤を用いて非特異的なハイブリダイゼーションを遮断する。このような遮断剤には、例えば、100 ~ 200 µg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。約35 ~ 50%の濃度のホルムアミドなどの有機溶剤が、例えば、RNAとDNAのハイブリダイゼーションなどの特定の場合に用いることができる。これらの洗浄条件を好適に変えることは、当業者には周知である。特に高い厳密性でのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド間の進化的類似性を示唆し得る。このような類似性は、それらヌクレオチド及びコードされたポリペプチドが同様の役割をしていることを強く示唆する。

【0072】

本明細書において「ハイブリダイゼーション複合体」とは、相補的な塩基対間の水素結合の形成によって、2つの核酸配列間に形成された複合体のことである。ハイブリダイゼーション複合体は溶液中（例えば、C₀tまたはR₀t分析）で形成されるか、或いは溶液中の1つの核酸配列と固体の支持物（例えば、紙、膜、フィルター、チップ、ピン、或いはスライドガラス、または細胞及びその核酸を固定する任意の適当な基板）に固定されたもう一つの核酸配列との間で形成され得る。

【0073】

本明細書において「挿入」或いは「付加」とは、1個以上のアミノ酸残基或いはヌクレオチドがそれぞれ追加されるアミノ酸配列或いは核酸配列の変化のことである。

【0074】

本明細書において「免疫応答」とは、炎症性疾患及び外傷、免疫異常、感染症、遺伝病などに関係する症状である。これらの症状は、細胞系及び全身防衛系に影響を及ぼすサイトカイン及びケモカイン、別の情報伝達分子などの様々な因子の発現によって特徴づけられ得る。

【0075】

本明細書において「免疫原性断片」とは、生きた生物、例えば哺乳類に導入されると、免疫応答を誘発し得るSNEYNのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片である。「免疫原性断片」はまた、当分野で周知の任意の抗体産生方法に用いられるSNEYNのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片も含む。

【0076】

本明細書において「マイクロアレイ」とは、基板上に配列された多数のポリヌクレオチド、ポリペプチド、または他の化学化合物のアレイのことである。

【0077】

本明細書のマイクロアレイの記述における「要素」或いは「アレイ要素」とは、基板上に固有の指定された位置を有するポリヌクレオチド、ポリペプチド、または他の化学化合物のことである。

【0078】

本明細書において「変調」とは、SNEYNの活性の変化のことである。変調の例として、SNEYNのタンパク質活性の特性、或いは結合特性、またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化がある。

【0079】

本明細書において「核酸」或いは「核酸配列」とは、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、或いはそれらの断片を指す。また、一本鎖若しくは二本鎖のセンス鎖或いはアンチセンス鎖であるゲノム若しくは合成起源のDNA或いはRNAと、またペプチド核酸(PNA)や任意のDNA様物質、RNA様物質も指す。

【0080】

本明細書における「機能的に結合した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある場合に用いられる。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。機能的に結合したDNA配列は、非常に近接或いは連続し、2つのタンパク質をコードする領域が結合する必要がある場合は、同じ読み枠内に存在し得る。

【0081】

本明細書において「ペプチド核酸(PNA)」とは、末端がリジンで終わるアミノ酸残基のペプチド骨格に結合した、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を含む、アンチセンス分子又は抗遺伝子剤のことである。この末端のリジンにより、この組成物が溶解性を有する。PNAは、相補的な一本鎖DNAやRNAに優先的に結合して転写物の伸長を止め、ポリエチレングリコール化して細胞において寿命を延ばし得る。

【0082】

本明細書においてSNEYNの「翻訳後修飾」には、脂質化(lipiation)及びグリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、タンパク分解性切断、及びその他の修飾が含まれ得る。これらのプロセスは、合成或いは生化学的に起こり得る。生化学的修飾は、SNEYNの酵素環境による細胞型によって変わる。

【0083】

本明細書において「プローブ」とは、SNEYNやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードする核酸配列のことであり、同一配列或いはアレル核酸配列、関連する核酸配列を検出するために用いる。プローブは、検出可能な標識またはレポーター分子が結合され、単離されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドである。典型的な標識には、放射性アイソトープ及びリガンド、化学発光試薬、酵素がある。

【0084】

本明細書において「プライマー」とは、相補的な塩基対を形成して標的のポリヌクレオチドにアニールし得る、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。このプライマーは、ポリヌクレオチドにアニールした後、あるDNAポリメラーゼによって、標的のDNA一本鎖に沿って延長される。プライマーの組は、例えば、PCR法による核酸配列の増幅(及び同定)に用いることができる。

【0085】

本発明に用いられるプローブ及びプライマーは、既知の配列の少なくとも15の連続するヌクレオチドからなる。特性を高めるために、長いプローブ及びプライマーが用いられることも可能である。例えば、開示した核酸配列の連続する少なく

とも20または25、30、40、50、60、70、80、90、100、150のヌクレオチドからなる。プローブ及びプライマーは、上記した例より相当長いものも用いることができ、本明細書の表及び図面、配列表に示された任意の長さのヌクレオチドも用いることができることを理解されたい。

【0086】

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

【0087】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、当分野で周知のそのような目的のためのコンピュータプログラムを用いて選択することができる。例えば、OLIGO 4.06ソフトウェアは、それぞれが100ヌクレオチドまでのPCR用のプライマーの対の選択、及び32,000塩基までの入力ポリヌクレオチド配列から5,000ヌクレオチドまでの大きなポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドの分析に有用である。類似のプライマー選択用プログラムには、能力を拡大する追加の機能が含まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム (Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TXより入手可能) は、メガベース配列から特定のプライマーを選択できるため、あるゲノムワイドスコープ (genome-wide scope) におけるプライマーの設計に有用である。Primer3プライマー選択プログラム (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MAより入手可能) によって、ユーザーは、プライマー結合部位にたくない配列を指定できる「非プライミングライブラリ」を入力

できる。また、Primer3は、特にマイクロアレイのオリゴヌクレオチドの選択に有用である。(後半の2つのプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれのソースから得ることができ、ユーザーの必要に応じて変更できる。) PrimerGenプログラム(UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UKより入手可能)は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計するため、アラインされた核酸配列の最も保存された領域或いは最も保存されていない領域のどちらかとハイブリダイズするプライマーの選択ができる。従って、このプログラムは、固有及び保存されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記した任意の選択方法で同定されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片は、例えば、PCR法やシークエンシングプライマー、マイクロアレイ要素、或いはサンプルの核酸の完全或いは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定する特定のプローブなどの、ハイブリダイゼーション技術に有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記した方法に制限されるものではない。

【0088】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグメントを人工的に組み合わせた配列である。この人工の組み合わせは、化学合成によって作られる場合が多いが、前出のSambrookに記載されたような遺伝子工学の技術を用いて核酸の離れたセグメントを人工的に操作するのがより一般的である。この「組換え核酸」には、単に核酸の一部の追加または置換、欠失によって変更された核酸を含む。しばしば、組換え核酸は、あるプロモーター配列に機能的に結合した核酸配列を含む。このような組換え核酸は、例えば、ある細胞を形質転換するのに用いられるベクターの一部であり得る。

【0089】

別法では、このような組換え核酸は、この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ことができ、その哺乳動物の防衛的な免疫応答を誘発するワクシニアウイルスに基づいたウイルスベクターの一部であり得る。

【0090】

本明細書における「調節要素」は、通常は、ある遺伝子の翻訳されない領域の

核酸配列であって、エンハンサー及びプロモーター、イントロン、5'及び3'の翻訳されない領域(UTR)が含まれる。調節要素は、転写及び翻訳、RNAの安定性を調節する宿主またはウイルスタンパク質と相互作用する。

【0091】

本明細書における「レポーター分子」は、核酸またはアミノ酸、抗体を標識するために用いる化学的或いは生化学的成分である。レポーター分子には、放射性核種と、酵素と、蛍光または化学発光剤、色素生産剤と、基質と、補助因子と、阻害剤と、磁気粒子と、当分野で既知の他の成分が含まれる。

【0092】

本明細書において、あるDNA配列に用いられる「RNA等価物」とは、基準となるDNA配列と同じ直鎖の核酸配列からなるが、窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の骨格がデオキシリボースではなくリボースからなるという点が異なる。

【0093】

本明細書において「サンプル」とは、その最も広い意味で用いられている。SN EXNをコードする核酸若しくはその断片、SNEXN自体を含むと推測されるサンプルには、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、細胞と、溶液中又は基板に固定されたゲノムDNA, RNA, cDNAと、組織又は組織プリント等も含まれ得る。

【0094】

本明細書において「特異的結合」または「特異的に結合する」とは、タンパク質或いはペプチドとアゴニスト或いは抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然或いは合成の結合組成物との間の相互作用のことである。この相互作用は、結合する分子によって認識される、例えば、抗原決定基つまりエピトープなどのタンパク質の特定の構造の存在によって左右される。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、結合していない標識した「A」及びその抗体を含む反応において、エピトープAを含むポリペプチドが存在するか或いは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体と結合する標識Aの量が減少する。

【0095】

本明細書において「実質的に精製された」とは、自然の環境から取り除かれてから、単離或いは分離された核酸配列或いはアミノ酸配列であって、自然に結合している構成要素が少なくとも約60%以上除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましいのは約90%以上除去されたものである。

【0096】

本明細書において「置換」とは、一つ以上のアミノ酸残基またはヌクレオチドをそれぞれ別のアミノ酸またはヌクレオチドに置き換えることである。

【0097】

本明細書における「基板」とは、任意の好適な固体或いは半固体の支持物であり、膜及びフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビード、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。この基板には、壁または塹壕、ピン、チャンネル、細孔などの様々な表面形態があり、そこにポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0098】

本明細書における「転写イメージ或いは転写画像」とは、ある時間に所定の条件の下で、特定の細胞型或いは組織による遺伝子発現の集合的なパターンのことである。

【0099】

本明細書において「形質転換」とは、外来DNAが受容細胞に導入されるプロセスのことである。形質転換は、当分野で周知の種々の方法により、自然或いは人工の条件の下で起こり得り、原核宿主細胞若しくは真核宿主細胞の中に外来核酸配列を挿入する任意の周知の方法によって行うことができる。この形質転換の方法は、形質転換される宿主細胞のタイプによって選択される。この方法には、バクテリオファージまたはウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、リポフェクション、及び微粒子照射が含まれるが、限定されるものではない。「形質転換された」細胞には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一時的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

【0100】

本明細書における「遺伝子組換え生物」とは、当分野で周知の遺伝子組換え技術などによって人間によって、生物の1つ以上の細胞に異種の核酸が導入された任意の生物であり、動物及び植物を含むが、それらに限定されるものではない。微量注入や組換えウイルスに感染させるなどの慎重な遺伝子操作によって、細胞の前駆体に直接或いは間接的に導入して、異種核酸を細胞に導入する。「遺伝子操作」には、典型的な交雑育種や*in vitro*での受精は含まれず、組換えDNA分子の導入を指す。本発明に従った遺伝子組換え生物には、細菌及びラン藻類、菌類、植物、動物が含まれる。本発明の単離されたDNAは、当分野で周知の、例えば、感染、形質移入、形質転換、トランス接合(transconjugation)などの方法によって、宿主に導入できる。本発明のDNAをそのような生物に導入する技術は周知であり、前出のSambrook他(1989)に記載されている。

【0101】

本明細書において「変異配列」とは、デフォルトパラメーターが設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いたblastnによって、核酸配列の1つの所定の長さにおける所定の核酸配列の同一性が、少なくとも40%と決定された核酸配列のことである。このような核酸の対は、所定の長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。ある変異体は、「アレル」または「スプライス」変異配列、「種」変異配列、「多形性」変異配列と示され得る。スプライス変異配列は基準分子と極めて同一性が高い可能性があるが、mRNAプロセッシング中のエキソンの交互のスプライシングによってポリヌクレオチドの数が多くなったり、少なくなったりする。対応するポリペプチドは、基準分子に存在する機能ドメインが加わったり、ドメインが欠落したりし得る。種変異配列は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。できたポリペプチドは、互いに高いアミノ酸同一性を有する。多形性変異配列は、所定の種と種の間の特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列における変異である。多形性変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つの塩基が異なる「1つのヌクレオチド多形性」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば、或る集団(

population)、病態、病態の特徴を表し得る。

【0102】

発明

本発明は、新規のヒトソーティングネキシン(SNEXN)、及びSNEXNをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、癌を含む、免疫異常症及び神経疾患、胃腸障害、遺伝障害、平滑筋異常症、細胞増殖症の診断及び治療、予防におけるこれらの組成物の使用に関する。

【0103】

表1は、SNEXNをコードする完全長のヌクレオチド配列を構築するために用いたインサイト社クローンのリストである。列1及び列2はそれぞれ、ペプチド及び核酸の配列番号(SEQ ID NO)を示す。列3は、それぞれのSNEXNをコードする核酸が同定されたインサイト社クローンのクローンIDを示し、列4は、これらのクローンを単離したcDNAライブラリを示す。列5は、インサイト社クローンID、及びそれに対応するcDNAライブラリを示す。列5のインサイト社クローンが、各SNEXNのコンセンサスヌクレオチド配列の導出に用いられ、ハイブリダイゼーション技術に有用である。

【0104】

表2の各列は、本発明の各ポリペプチドの様々な特徴を示す。列1は配列番号(SEQ ID NO)、列2は各ポリペプチドのアミノ酸残基数、列3は潜在リン酸化部位、列4は潜在グリコシル化部位、列5はサイン配列(signature sequence)及びモチーフを含むアミノ酸残基、列6はBLAST分析によって同定された相同配列、列7は分析方法及び(該当部分については)分析方法が利用できる検索可能なデータベースをそれぞれ示す。

【0105】

表3の各列は、SNEXNをコードするヌクレオチド配列に関連する組織特異性、及び疾患及び異常、症状を示す。表3の列1はヌクレオチドの配列番号(SEQ ID NO)を示す。列2は、列1のヌクレオチド配列の断片を示す。これらの断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用であり、SEQ ID NO:3-4の同定し、SEQ ID NO:3-4と関連するポリヌクレオチド配列とを区別する。これ

らの断片によってコードされるポリペプチドは、例えば、免疫原性ペプチドとして有用である。列3は、SNEYNを発現する全組織に対するその分類された組織がSNEYNを発現する割合を示す。列4は、SNEYNを発現する全組織に対するSNEYNを発現する組織に関連した疾患及び異常症、状態の割合を示す。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す。

【0106】

表4の各コラムは、SNEYNをコードするcDNAクローンを単離したcDNAライブラリを作製するために用いられた組織の説明を示す。列1は、ヌクレオチドの配列番号を示し、列2は、これらのクローンを単離したcDNAライブラリを示し、列3は、列2のcDNAライブラリについての組織起源及び説明を示す。

【0107】

SEQ ID NO:3は、染色体6の91.8から96.1センチモルガンまでの区間の染色体地図である。この区間には、分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼのE1-サブユニットの欠陥によって起こる、メープルシロップ尿症に関連する遺伝子及びESTが含まれる。SEQ ID NO:4は、染色体3の140.00から148.70センチモルガンまでの区間の染色体地図である。

【0108】

本発明はまた、SNEYNの変異体を含む。SNEYNの変異体は、SNEYNのアミノ酸配列と好ましくは約80%以上の配列同一性、更に好ましくは約90%以上の配列同一性、最も好ましくは約95%以上の配列同一性を有し、SNEYNの機能的特性或いは構造的特性のうちの少なくとも1つを含む。

【0109】

本発明はまた、SNEYNをコードするポリヌクレオチドを含む。特定の実施例において、本発明は、SNEYNをコードするSEQ ID NO:3-4からなるグループから選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を含む。配列表に示されているSEQ ID NO:3-4のポリヌクレオチド配列はRNA等価配列を含む。但し、窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の骨格がデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0110】

本発明はまた、SNEYNをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。詳細には、このようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、SNEYNをコードするポリヌクレオチド配列と70%以上のポリヌクレオチド配列同一性、または85%以上のポリヌクレオチド配列同一性、または95%以上のポリヌクレオチド配列同一性を有する。本発明の特定の実施形態は、SEQ ID NO:3-4からなるグループから選択された核酸配列と70%以上のポリヌクレオチド配列同一性、または85%以上のポリヌクレオチド配列同一性、または95%以上ポリヌクレオチド配列同一性を有するSEQ ID NO:3-4からなるグループから選択された配列を含むポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記したポリヌクレオチド変異配列のすべてが、SNEYNの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードする。

【0111】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るSNEYNをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、既知の自然発生する任意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ものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したがって本発明には、可能なコドン選択に基づいた組み合わせの選択によって作り出され得る可能なポリヌクレオチド配列の変異の全てが含まれ得る。これらの組み合わせは、自然発生のSNEYNのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られ、全ての変異が明確に開示されていると考慮する。

【0112】

SNEYNをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は、好適に選択された厳密な条件の下で、自然発生のSNEYNのヌクレオチドとハイブリダイズ可能なことが望ましいが、非自然発生のコドンを含めるなどの実質的に異なったコドンの使用を有するSNEYN或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作り出すことは有益となり得る。特定のコドンが宿主によって利用される頻度に基づいてコドンを選択して、ペプチドの発現が特定の真核細胞又は原核宿主に発生する割合を高めることが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えないで、SNEYN及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、

自然発生の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることにある。

【0113】

本発明はまた、SNEYN及びその誘導体をコードするDNA配列又はそれらの断片を完全に合成化学によって作り出すことも含む。作製後にこの合成配列を、当分野で良く知られた試薬を用いて、種々の入手可能な発現ベクター及び細胞系の何れの中にも挿入可能である。更に、合成化学を用いて、SNEYNまたはその任意の断片をコードする配列の中に突然変異を導入することも可能である。

【0114】

更に本発明には、種々の厳密性条件の下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:3 - 4及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G.M.及びS.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; and Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.を参照)。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載されている。

【0115】

DNAのシーケンシング及び解析方法は当分野で周知であり、本発明の任意の実施例を実行する際に用いることが可能である。この方法には、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片であるSEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (PE Biosystems, Foster City CA)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)、或いはELONGASE増幅システム(Life Technologies, Inc., Rockville, MD)にみられるような校正エキソヌクレアーゼとポリメラーゼとの組み合わせなどの酵素が用いられる。配列の準備には、MICROLAB 2200 液体転移システム (Hamilton, Co., Reno, NV) 及びPTC 200 thermal cycler (MJ Research, Watertown MA)、ABI CATALYST 800 thermal cycler (PE Biosystems) などの装置を用いて自動化するのが好ましい。次に、ABI 373 または 377 シーケンシングシステム (PE Biosystems)、または MEGABACE™ 1000 DNA シーケンシングシステム(Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA)、または当分野で周知の他のシステムを用いて、シーケンシング

が続けることが可能である。得られた配列を当分野で周知の様々なアルゴリズムを用いて分析する(例えば、Ausubel F.M.(1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, unit 7.7; Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY を参照)。

【0116】

部分的なヌクレオチド配列を利用し、当分野で周知のPCR法をベースにした種々の方法を用いてSNEXNをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節要素などの上流にある配列を検出する。例えば制限部位PCR法を利用する1つの方法では、一般的なプライマー及びネスト化プライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する(例えば、Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2:318-322を参照)。逆PCR法を用いる別法では、広範な方向に伸長して環状化した鋳型から未知の配列を増幅するプライマーを用いる。この鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限断片に由来する(例えば、Triglia, T.等(1988) Nucleic Acids Res 16:8186を参照)。キャプチャPCR法を用いる第3の方法は、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断片のPCR増幅を含む(例えば、Lagerstrom, M.他(1991) PCR Methods Applic 1:111-119を参照)。この方法では、多数の制限酵素による消化及びライゲーションを用いて、PCRを行う前に未知の配列の領域の中に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、当分野で周知の別の方法を用いて未知の配列を得ることも可能である。(例えば、Parker, J.D.他(1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-3060を参照)。更に、PCR、ネスト化プライマー、PROMOTERFINDERライブラリ(Clontech, Palo Alto CA)を用いれば、ゲノムDNA内の歩行が可能である。この方法ではライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を探すのに有用である。全てのPCR法をベースにした方法では、プライマーは、市販のOLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムなどを用いて、長さが22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上、約68~72の温度で鋳型に対してアニールするよう設計される。

【0117】

完全な長さのcDNAのスクリーニングの際は、大きなcDNAを含むようにサイズが選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、オリゴd(T)ライブラリが完全な長さのcDNAを産生できない場合は、遺伝子の5'領域を有する配列を含むものが多いランダムに初回抗原刺激を受けたライブラリが有用である。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。

【0118】

市販の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産物のヌクレオチド配列のサイズの分析、または確認が可能である。詳しくは、キャピラリーシーケンシングには、電気泳動による分離のための流動性ポリマー、及び4つの異なったヌクレオチドに特異的なレーザーで活性化される蛍光色素、放出された波長の検出に利用するCCDカメラを使用することが可能である。出力/光強度は、適切なソフトウェア(例えば、GENOTYPER及びSEQUENCE NAVIGATOR、PE Biosystems)を用いて電気信号に変換され、サンプルのローディングからコンピュータ分析までのプロセス及び電子データ表示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場合もあるDNAの小片のシーケンシングに特に適している。

【0119】

本発明の別の実施例では、SNEYNをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を組換えDNA分子に用いて、適切な宿主細胞内にSNEYN、その断片または機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号固有の宿重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のアミノ酸配列をコードする別のDNA配列が作られ得り、これらの配列をSNEYNのクローン化及び発現に利用可能である。

【0120】

種々の目的でSNEYNをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシング及び/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。ランダムな断片によるDNAの混合や遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドのPCR再組み立てを用いて、又

クレオチド配列の組換えが可能である。例えば、オリゴヌクレオチドの仲介による定方向突然変異誘発を利用して、新しい制限部位を生成する突然変異の導入、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライスバリエーションの生成等が可能である。

【0121】

本発明のヌクレオチドに、MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; U.S. Patent Number 5,837,458; Chang, C.-C. 他 (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他 (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. 他 (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)などのDNA混合技術を適用して、SNEYNの生物学的または酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのSNEYNの生物学的特性を変更或いは向上させることができる。DNA混合は、PCR法による遺伝子断片の組換えで遺伝子変異体のライブラリが作製されるプロセスである。次に、このライブラリは、目的の特性を有する遺伝子変異体を同定する選択或いはスクリーニングが行われる。これらの好ましい変異体はプールされ、DNA混合及び選択/スクリーニングが繰り返される。従って、人工的な育種及び急速な分子の進化によって多様な遺伝子が作られる。例えば、ランダムな位置に変異をもつ1つの遺伝子の断片を組換えてスクリーニングし、目的の特性が最適となるまで混合が行われる。別法では、所定の遺伝子の断片を、同じ或いは異なった種の同じ遺伝子ファミリーの相同な遺伝子の断片で組換えることで、指向的かつ調節可能な方法で、多数の天然の遺伝子の遺伝子多様性を最大化することができる。

【0122】

別の実施例によれば、SNEYNをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である(例えば、Caruthers, M.H.等 (1980) Nucleic Acids Symp Ser 7:215-223; 及びHorn, T.他 (1980) Nucl. Acids Res Symp. Ser.225-232を参照)。別法として、化学的方法を用いてSNEYN自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、ペプチド合成は種々の液相または固相技術を用いて実行可能である(例えば、Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY, pp. 5

5-60;及び Roberge, J.Y. 他 (1995) Science 269:202-204.を参照)。また、合成の自動化は例えばABI 431Aペプチドシンセサイザ (PE Biosystems) を用いて達成し得る。更にSNEXNのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、変異体ポリペプチドまたは天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドを作ることが可能である。

【0123】

このペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィー(例えば、Chiez, R.M. 及び F.Z. Regnier (1990)Methods Enzymol. 182:392-421を参照)を用いて実質的に精製可能である。合成されたペプチドの組成は、アミノ酸分析或いはシークエンシングで確認することができる(例えば、Creighton, 前出, pp. 28-53を参照)。

【0124】

生物学的に活性のSNEXNを発現させるために、SNEXN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。この発現ベクターは、好適な宿主に挿入されたコード配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含む。これらの要素には、ベクター及びSNEXNをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このような要素は、その長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、SNEXNをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、ATG開始コドン及びコザック配列などの近傍の配列が含まれる。SNEXN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、コード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なければならない。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、自然及び合成の様々なものから得ることが可能である。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。(例えば、Scharf, D. 他 (1994)

Results Probl. Cell Differ. 20:125-162.を参照)。

【0125】

当業者に周知の方法を用いて、SNEXNをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節要素を含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる。(例えば、Sambrook, J. 他. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 4章及び8章, 及び16-17章; 及び Ausubel, F.M. 他. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY. 9章及び13章、16章を参照)。

【0126】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、SNEXNをコードする配列を含ませ、発現させることが可能である。これらには、限定するものではないが、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れた細菌などの微生物や、酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌や、ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV、タバコモザイクウイルス、TMV)または細菌発現ベクター(例えば、TiまたはpBR322プラスミド)で形質転換された植物細胞系や、動物細胞系などが含まれる(例えば、Sambrook, 前出; Ausubel, 前出; Van Heeke, G. 及び S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509; Bitter, G.A. 他. (1987) Methods Enzymol. 153:516-544; Scorer, C.A. 他 (1994) Bio/Technology 12:181-184; Engelhard, E.K. 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945; Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307-311; Coruzzi, G. 他 (1984) EMBO J. 3:1671-1680; Broglie, R. 他 (1984) Science 224:838-843; Winter, J. 他 (1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105; The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196; Logan, J. 及び T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659; 及び Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355.)。レトロウイルスまたはアデノウイルス、ヘルペ

すまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌プラスミド由来の発現ベクターを用いて、標的の器官及び組織、細胞集団にヌクレオチド配列を輸送することが可能である(例えば、Di Nicola, M. 他 (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356; Yu, M. 他, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13):6340-6344; Buller, R.M. 他 (1985) *Nature* 317(6040):813-815; McGregor, D.P. 他 (1994) *Mol. Immunol.* 31(3):219-226; Verma, I.M. 及び N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242.を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【0127】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、SNEYN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選択可能である。例えば、SNEYN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、増殖には、pBLUESCRIPT プラスミド(Stratagene, La Jolla CA)またはpSPORT 1 プラスミド(Life Technologies)などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターの多数のクローニング部位にSNEYNをコードする配列をライゲーションするとlacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更に、これらのベクターを用いて、クローニングされた配列の*in vitro*での転写、ジデオキシンスクリーニング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失を作り出すことが可能である。(例えば、Van Heeke, G.及びS.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509.を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のSNEYNが必要な場合は、SNEYN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、強力に発現を誘発するT5またはT7バクテリオファージプロモーターを含むベクターを使用できる。

【0128】

SNEYNの発現に酵母の発現系の使用が可能である。酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは*Pichia pastoris*では、 因子やアルコールオキシダーゼやPGHプロモーターなどの構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多種のベクターが使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌が

細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む（例えば、Ausubel, 1995, 前出; Bitter, 前出; 及び Scorer, 前出を参照）。

【0129】

植物系もSNEYNの発現に使用可能である。SNEYNをコードする配列の転写は、例えば、CaMV由来の35S及び19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターが単独で、或いはTMV (Takamatsu, 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行われる。別法では、RUBISCOの小さなサブユニットや熱ショックプロモーターなどの植物プロモーターを用いることができる（例えば、Coruzzi, 前出; Broglie, 前出; 及び Winter, 前出を参照）。これらの作製物は、直接のDNA形質転換或いは病原体を介したトランスフェクションによって、植物細胞の中に導入可能である。（例えば、The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill NY, pp.191-196を参照）。

【0130】

哺乳動物細胞では、多種のウイルスベースの発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写物/翻訳複合体にSNEYNをコードする配列を結合し得る。ウイルスのゲノムの非必須のE1またはE3領域への挿入により、感染した宿主細胞にSNEYNを発現する生ウイルスを得ることが可能である（例えば、Logan, J.及びT. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659を参照）。さらに、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなど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ることが可能である。タンパク質を高レベルで発現させるために、SV40またはEBVを基にしたベクターを用いることが可能である。

【0131】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドで発現しそれに含まれているものより大きなDNAの断片を供給可能である。治療のために約6kb~10MbのHACsを作製し、従来方法(リボソーム、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(例えば、Harrington, J.J. 他(1997) *Nat. Gene* t.15:345-355.を参照)。

【0132】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞におけるSNEYNの安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターを用いて、SNEYNをコードする配列を株化細胞に形質転換することが可能である。このような発現ベクターは、ウイルス起源の複製及び/または内在性の発現要素や、同じ或いは別のベクターの上の選択マーカー遺伝子を含む。ベクターの導入の後、細胞を選択培地に移す前に、強化培地で約1~2日の間増殖させる。選択マーカーの目的は選択的な媒介物に対する抵抗性を与えるとともに、その存在により導入された配列をうまく発現する細胞の増殖及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に好適な組織培養技術を用いて増殖可能である。

【0133】

任意の数の選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収することが可能である。選択系には、以下のものに限定はしないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれ、それぞれ tk^{-} 又は $aprt^{-}$ 細胞において使用される(例えば、Wigler, M. 他(1977) *Cell* 11:223-232; Lowy, I. 他(1980) *Cell* 22:817-823を参照)。また代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を選択のベースとして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 或いは pat はクロルスルフロン(chlorsulfuron)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(phosphinotricin acetyltransferase)に対する耐性を与える(例えば、Wigler, M. 他.(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. 他(1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14を参照)。さらに選択に利用できる遺伝子、例えば、代謝のために細胞が必要なものを変える $trpB$ 及び $hisD$ が文献に記載されている(例えば、Hartman, S.C.及びR.C. Mulligan(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047-51を参照)。アノトシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP; Cl

ontech)、 β -グルクロニダーゼ及びその基質 β -グルクロニド、ルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリンなどの可視マーカーが用いることができる。緑色蛍光タンパク質(GFP)(Clontech, Palo Alto, CA)も使用できる。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(例えば、Rhodes, C.A.他(1995) Methods Mol. Biol. 55:121-791を参照)。

【0134】

マーカー遺伝子の発現の存在/不在によって目的の遺伝子の存在が示されても、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、SNEYNをコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、SNEYNをコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により特定可能である。または、1つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子がSNEYNをコードする配列と一列に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。

【0135】

一般に、SNEYNをコードする核酸配列を含み、SNEYNを発現する宿主細胞は、当業者に周知の種々の方法を用いて特定することが可能である。これらの方法には、DNA-DNA或いはDNA-RNAハイブリダイゼーションや、PCR法、核酸或いはタンパク質の検出及び/または数量化のための膜系、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生物学的試験法または免疫学的アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0136】

特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いるSNEYNの発現の検出及び計測のための免疫学的方法は、当分野で周知である。このような技法には、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)、蛍光標示式細胞分取器(FACS)などがある。SNEYN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部位のモノクローナルベースイムノアッセイ(two-site, monoclonal-based immunoassay)が好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ

及びその他のアッセイは、当分野では十分に知られている。(例えば、Hampton. R. 他.(1990) Serological Methods, a Manual, APS Press. St Paul. MN, Section IV; Coligan. J. E. 他 (1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York. NY: 及び Pound. J.D. 他 (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ.を参照)。

【0137】

種々の標識方法及び結合方法が当業者には周知であり、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイに用いられ得る。SNEYN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プローブを生成する方法には、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増幅が含まれる。別法として、SNEYNをコードする配列、またはその任意の断片をmRNAプローブを生成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。当分野では周知であり市販されているこのようなベクターを、T7, T3, またはSP6などの好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドの追加によって、in vitroでのRNAプローブの合成に用いることができる。これらの方法は、例えば、Amersham Pharmacia Biotech及びPromega (Madison WI)、U.S. Biochemicalが市販する種々のキットを用いて行うことができる。容易な検出の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、インヒビター、磁気粒子、及び放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、色素産生剤などが含まれる。

【0138】

SNEYNをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でのこのタンパク質の出現及び回収に好適な条件の下で培養される。形質転換された細胞で作製されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用されるその配列及び/またはそのベクターによる。SNEYNをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜及び真核細胞膜を通してSNEYNの分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できることは、当業者には理解されよう。

【0139】

更に、挿入した配列の発現調節能力またはタンパク質の発現を所望の形にプロセシングする能力によって宿主細胞株が選択される。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 (lipidation)、及びアシル化が含まれるが、これらに限定されるものではない。タンパク質の「prepro」形を切断する翻訳後のプロセシングを利用して、標的タンパク質、折りたたみ及び/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための特定の細胞装置及び特徴のある機構をもつ異なった宿主細胞 (例えば、CHO、HeLa、MDCK、HEK293、WI38) が American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) より入手可能であり、外来のタンパク質の正しい修飾及びプロセシングを確実にするために選択される。

【0140】

本発明の別の実施例では、SNEYNをコードする自然或いは変更された、または組換えの核酸配列を上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に結合させる。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラSNEYNタンパク質が、SNEYNの活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分が、市販の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。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-mc、赤血球凝集素 (HA) が含まれるが、これらに限定されるものではない。GST及びMBP、Trx、CBP、6-Hisによって、固定されたグルタチオン、マルトース、フェニルアルシン酸化物 (phenylarsine oxide)、カルモジュリン、金属キレート樹脂のそれぞれで同族の融合タンパク質の精製が可能となる。FLAG、c-mc、及び赤血球凝集素 (HA) によって、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた融合タンパク質の免疫親和性の精製ができる。また、SNEYNをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、SN

EXNが精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現と精製の方法は、Ausubel. (1995, 前出, ch. 10) に記載されている。様々な市販されているキットを用いて、融合タンパク質の発現及び精製を促進することができる。

【0141】

本発明の別の実施例では、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in vitroで放射能標識したSNEYNの合成が可能である。これらの系は、T7またはT3、SP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質をコードする配列の転写と翻訳をつなげる。翻訳は、例えば、35Sメチオニンである放射能標識されたアミノ酸前駆体の存在の下で起こる。

【0142】

本発明のSNEYNまたはその断片を用いて、SNEYNと特異的に結合する化合物のスクリーニングが可能である。少なくとも1つまたは複数の試験用化合物を、SNEYNへの特異的結合を調べるためにスクリーニングする。試験用化合物には、抗体やオリゴヌクレオチド、タンパク質(例えば、受容体)、小分子が含まれる。

【0143】

ある実施例では、このように同定された化合物は、例えば、SNEYNのリガンドや断片、天然の基質、構造的または機能的な擬態、天然結合パートナーなどのSNEYNの天然のリガンドに密接な関連がある(Coligan, J.E. 他(1991) *Current Protocols in Immunology* 1(2):Chapter 5.を参照)。同様に、この化合物は、SNEYNに結合する天然の受容体またはリガンド結合部位などの受容体の少なくとも断片と密接な関連がある。どちらの場合も、この化合物は、既知の技術を用いて合理的に設計される。ある実施例では、これらの化合物のスクリーニングは、分泌タンパク質として或いは細胞膜上でSNEYNを発現する好適な細胞の作製を伴う。好適な細胞には、哺乳類や酵母、ショウジョウバエ、大腸菌からの細胞が含まれる。SNEYNを発現する細胞またはSNEYNを含む細胞膜分画をある試験用化合物と接触させ、SNEYNまたは化合物の結合や刺激、活性の阻害を分析する。

【0144】

あるアッセイで、試験用化合物とポリペプチドの結合を単に検査する。このとき、結合は、フルオロフォア、放射性アイソトープ、酵素抱合体、または別の検

出可能な標識によって検出される。例えば、このアッセイには、溶液の中で或いは固体の支持物に固定させて、SNEYNと少なくとも1つの化合物を結合させて、SNEYNと化合物の結合を検出する過程も含まれ得る。別法では、このアッセイは、標識された競合相手の存在の下で、ある試験用化合物の検出或いは測定をすることもできる。更に、このアッセイは、細胞を含まない製剤、化学ライブラリまたは天然産物の混合物を用い、試験用化合物が溶液の中で自由な状態、或いは固体支持物に固定されて行われる。

【0145】

本発明のSNEYNまたはその断片を用いて、SNEYNの活性を変調する化合物のスクリーニングが可能である。このような化合物には、アゴニスト、アンタゴニスト、部分アゴニストまたは逆作用薬が含まれ得る。ある実施例では、アッセイを、SNEYNの活性が許容される条件で行い、SNEYNを少なくとも1つの試験用化合物と結合させ、試験用化合物が存在する場合のSNEYNの活性と試験用化合物が存在しない場合のSNEYNの活性とを比較する。試験用化合物が存在する場合のSNEYNの活性のある変化は、SNEYNの活性を変調する化合物を示唆する。別法では、ある試験用化合物を、SNEYNの活性に好適な条件の下で、SNEYNを含む細胞の存在しない系または*in vitro*で結合させてアッセイを行う。これらのどのアッセイの場合も、SNEYNの活性を変調する試験用化合物はSNEYNを間接的に変調し、直接接触する必要はない。少なくとも1つまたは複数の試験用化合物をスクリーニング可能である。

【0146】

別の実施例では、SNEYNをコードするポリヌクレオチドまたはそれらの哺乳類の相同体が、胚幹細胞（ES細胞）の相同的組換えによって、ある動物モデル系でノックアウトされる。このような技術は当分野では周知であり、ヒトの疾患を動物モデルで発生させるのに有用である（例えば、U.S. Patent No. 5,175,383 and U.S. Patent No. 5,767,337を参照）。例えば、マウス129/SvJ細胞株などのマウスのES細胞をマウスの初期胚から採取して培養液で成長させる。このES細胞を、例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子などのマーカー遺伝子によって標識された目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する（neo; Capecch

i, M.R. (1989) Science 244:1288-1292)。このベクターを、相同的組換えによって、宿主ゲノムの対応する領域に組込む。別法では、Cre-loxP systemを用いて、組織特異的または発達段階特異的に相同的組換えを行い、目的の遺伝子をノックアウトする (Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330)。形質転換されたES細胞を同定し、C57BL/6マウス株などからのマウス細胞胚盤胞に微量注入する。この胚盤胞を、外科手術的に偽妊娠雌に移し、得られるキメラ子孫が遺伝子型を受け継ぎ、ヘテロ接合株またはホモ接合株を産生するように育種する。このように作られた遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒物で検査することが可能である。

【0147】

SNEXNをコードするポリヌクレオチドを、*in vitro*でヒトの胚盤胞から得たES細胞に導入する。ヒトES細胞は、内胚葉及び中胚葉、外胚葉の細胞型を含む少なくとも8つの異なった細胞系譜に分化する能力をもつ。これらの細胞系譜は、例えば、神経細胞や造血系、心筋細胞に分化する (Thomson, J.A. 他 (1998) Science 282:1145-1147)。

【0148】

SNEXNをコードするポリヌクレオチドを用いて、「ノックイン (knockin)」ヒト化動物 (ブタ) や遺伝子組換え動物 (マウスまたはラット) を作って、ヒトの病気モデルにする。ノックイン技術を用いて、SNEXNをコードするポリヌクレオチドのある領域を動物ES細胞に注入し、それによって注入された配列が動物細胞ゲノムに組込まれる。形質転換された細胞を胞胚に注入し、この胞胚を上記したようにインプラントする。遺伝子組換え子孫または近交系を研究して潜在的な薬剤で治療し、ヒトの疾患の治療における情報を入手する。別法では、例えば、母乳にSNEXNを分泌させるなどして、SNEXNを過剰に発現する哺乳近交動物が、そのようなタンパク質の便利な供給源となる (Janne, J. 他 (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74)。

【0149】

治療

SNEXN領域とソーティングタンパク質の領域との間に、配列及びモチーフにお

ける化学的及び構造的類似性が存在する。更に、SNEYNの発現は、癌及び細胞増殖症、炎症、胃腸組織、神経組織と密接な関係がある。従って、SNEYNが、癌を含む、免疫異常症及び神経疾患、胃腸障害、遺伝障害、平滑筋異常症、細胞増殖症において一定の役割を果たしていると考えられる。SNEYNの発現や活性の増大に関連する疾患の治療において、SNEYNの発現や活性を低下させることが望ましい。NEXNの発現や活性の低下に関連する疾患の治療において、SNEYNの発現や活性を増大させることが望ましい。

【0150】

従って、ある実施例では、NEXNの発現や活性の低下に関連する疾患を予防及び治療するために、そのような患者にSNEYN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、このような疾患には、免疫異常症が含まれ、その中には、炎症、日光性角化症、後天性免疫不全症候群（AIDS）及び副腎機能不全、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、動脈硬化、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、気管支炎、滑液包炎、胆嚢炎、硬変、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、胎児赤芽球症、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、発作性夜間血色素尿症、肝炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、混合型結合組織病（MCTD）、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎症、骨髄線維症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、真正赤血球増加症、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、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、原発性血小板血症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、リンパ腫及び白血病、骨髄腫を含む造血性の癌、外傷が含まれ、また、神経疾患も含まれ、その中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及び他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化症及び他の運動ニューロン疾患、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、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、クールー及びクロイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、Gerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含むプリオン病 (prion disease) と、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、中枢神経系性精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症 (neuroskeletal disorder)、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィー及び他の神経筋障害、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性及び代謝性、内分泌性の中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分性及び不安性の分裂病性障害を含む精神障害と、季節性感情障害 (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、妄想性精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上性麻痺、皮質基底変性症 (corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭痴呆が含まれ、また、胃腸疾患も含まれ、その中には、食道炎、食道癌、胃炎、胃癌、炎症性腸疾患、胆嚢炎、腸管の炎症、膵臓炎、膵臓癌、硬変、肝炎、ヘパトーム、大腸炎、結腸癌、クローン病が含まれ、また、遺伝障害も含まれ、その中には、副腎白質ジストロトフィ、アルポート症候群、コロイデレミア、デュシェンヌ - ベッカー型筋ジストロフィ、ダウン症候群、嚢胞性線維症、慢性肉芽腫症、ゴーシェ病、ハンチントン病、マルファン症候群、筋ジストロフィ、筋緊張性異栄養、頻繁骨形成不全 (pycnodysostosis)、レフサム症候群、網膜芽腫、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ウェルナー症候群、フォン ウィルブラント病、ウィルムス腫瘍、ツェルヴェーガー症候群、ペルオキシソームアシル-CoA酸化酵素欠損症 (peroxisomal acyl-CoA oxidase deficiency)、ペルオキシソームチオラーゼ欠損症、ペルオキシソーム2官能タンパク質欠損症、ミトコンドリアカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ及びカルニチン欠損症、ミトコンドリア超長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア電子伝達フラボタンパク質及び電子伝達フラボタンパク質：ユビキノンオキシドレダクターゼ欠損症、ミトコンドリア3官能タンパク質欠損症、ミトコンドリア短鎖3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲ

ナーゼ欠損症が含まれ、また、平滑筋異常も含まれ、その中には、口峡炎、アナフィラキシー、不整脈、喘息、心血管ショック、クッシング症候群、高血圧、低血糖症、心筋梗塞、片頭痛、褐色細胞腫と、心筋症及び脳症、癲癇、カーンズセイヤ症候群、乳酸アシドーシス、筋クローヌス性障害、眼筋麻痺、ここで、平滑筋には血管、胃腸管、心臓、子宮などが含まれ、更に細胞増殖異常症が含まれ、その中には、日光性角化症及び動脈硬化、アテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、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、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、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、子宮の癌などが含まれる。

【0151】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むSNEYNの発現または活性の低下に関連する疾患の治療または予防のために、SNEYN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することも可能である。

【0152】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むSNEYNの発現または活性の低下に関連する疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたSNEYNを含む医薬品組成物を好適な医薬用担体と共に患者に投与することも可能である。

【0153】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むSNEYNの発現または活性の低下に関連する疾患の治療または予防のために、SNEYNの活性を変調するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【0154】

別の実施例において、限定するものではないが上に列記した疾患を含むSNEYNの発現または活性の増大に関連する疾患の治療または予防のために、SNEYNのアнтаゴニストを患者に投与することが可能である。限定するものではないが、こ

のような疾患には上記した、癌を含む、免疫異常症及び神経疾患、胃腸障害、遺伝障害、平滑筋異常症、細胞増殖症が含まれる。一実施態様では、SNEYNと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはSNEYNを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶ標的或いは運搬機構として間接的に用いられ得る。

【0155】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むSNEYNの発現または活性の増大に関連する疾患の治療または予防のために、SNEYNをコードするポリヌクレオチドの相補体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。

【0156】

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、相補的な配列、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。当業者は、従来の医薬原理にしたがって併用療法で用いる好適な治療薬を選択可能である。治療薬との組み合わせにより、上に列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。この方法を用いて少ない量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能であり、広範囲な副作用の可能性を低減し得る。

【0157】

SNEYNのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。詳しくは、精製されたSNEYNを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてSNEYNと特異的に結合するものを同定が可能である。SNEYNの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。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、F a bフラグメント、及びF a b発現ライブラリによって作られたフラグメントが含まれる。但し、これらに限定されるものではない。治療用には、中和抗体（即ち、二量体の形成を阻害するもの）が特に好ましい。

【0158】

抗体の作製のために、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、SNEYNまたは免疫原性の特性を備えるその任意の断片やオリゴペプチドの注入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。このようなアジュバントにはフロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲルアジュバント、リゾレシチン、プ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、及びジニトロフェノールなどの界面活性剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG (bacilli Calmette-Guerin) 及びCorynebacterium parvumが特に好ましい。

【0159】

SNEXNに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、または断片は、約5以上のアミノ酸からなるアミノ酸配列が望ましく、一般には約10以上のアミノ酸からなるものである。これらのオリゴペプチド或いはペプチド、またはそれらの断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましく、小さな自然発生の分子のアミノ酸配列全体も含む。SNEXNアミノ酸の短い伸展部は、KLH(キーホールリンペットヘモシニアン)などの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0160】

SNEXNに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製することが可能である。これらの技術には、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含まれるが、これらに限定されるものではない(例えば、Kohler, G. 等. (1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D. 等. (1985) .J. Immunol. Methods 81.:31-42; Cote, R.J. 等. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030; Cole, S.P. 等. (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120を参照)。

【0161】

更に、「キメラ抗体」の作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる(例えば、Morrison, S.L.他. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855; Neuberger, M.S.他. (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.等. (1985) Nature 314:452,454を参照)。別法では、当分野

で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、SNEYN特異性一本鎖抗体を生成する。関連する特異性を備えるが別のイデオタイプ組成の抗体は、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリから鎖混合によって生成することもできる（例えば、Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:11120-3を参照）。

【0162】

抗体は、in vivoでのリンパ球集団の中の生成を誘発することによって、または免疫グロブリンライブラリのスクリーニング又は文献に示されているような、高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって、作製することもできる（例えば、Orlandi, R. 他. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837; Winter, G. 他. (1991) Nature 349:293-299を参照）。

【0163】

SNEYNに対する特異的な結合部位を含む抗体の断片も作製することができる。例えば、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって生成されるF(a b')₂断片と、F(a b')₂断片のジスルフィド架橋を減じることによって生成されるF a b断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。別法では、F a b発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性とモノクローナルF a b断片の迅速且つ容易な同定が可能となる（例えば、Huse, W.D. 等. (1989) Science 246:1275-1281を参照）。

【0164】

種々のイムノアッセイでスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定する。隔離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競合的な結合、または免疫放射線活性のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、SNEYNとその特異性抗体との間の複合体調整の計測が含まれる。二つの非干渉性SNEYNエピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが好ましいが、競合的結合アッセイも利用することができる(Maddox、前出)。

【0165】

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析などの様々な方法を用いて、S NEXN抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数 K_a で表すが、この K_a は、平衡状態の下でS NEXN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ものである。多数のS NEXNエピトープに対して親和性が不均一なポリクロナール抗体試薬の測定値 K_a は、S NEXN抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定のS NEXNエピトープに単一特異的なモノクロナール抗体試薬の K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が $10^9 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ の高親和性抗体試薬は、S NEXN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 $10^6 \sim 10^7 \text{ L/mol}$ の低親和性抗体試薬は、S NEXN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 (immunopurification) 及び類似の処理に用いるのが好ましい。(Catty, D. (1988) *Antibodies, Volume I: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, DC; Liddel I, J. E. and A. Cryer, (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0166】

ポリクロナール抗体試薬の抗体価及び結合活性を更に評価して、或る下流処理におけるこのような試薬の品質及び適性を調べる。例えば、少なくとも $1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ の特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10 \text{ mg/ml}$ の特異的な抗体を含むポリクロナール抗体試薬の使用は、S NEXN抗体複合体を沈殿させなければならない処理に適している。様々な適用例における抗体の特異性及び抗体価、結合活性、抗体の品質や使用法の指針は一般に入手可能である。(例えば、Catty, 前出、及びColigan 他、前出を参照)。

【0167】

本発明の別の実施例では、S NEXNをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片または相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施形態では、S NEXNをコードする遺伝子の調節領域またはコード領域に対して相補的な配列またはアンチセンス分子 (DNA、RNA、PNA、修飾されたオリゴヌクレオチド) を設計して、遺伝子発現を調節することが可能である。このような技術は当分野では周知であり、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

断片が、SNEYNをコードする配列の制御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である（例えば、Agrawal, S., ed. (1996) *Antisense Therapeutics*, Humana Press Inc., Totawa NJ.を参照）。

【0168】

治療目的で、好適な標的細胞にアンチセンス配列を導入するのに適した任意の遺伝子輸送系を用いることができる。アンチセンス配列を、転写されると目的のタンパク質をコードする細胞内配列の少なくとも一部に相補的な配列を産生する発現プラスミドの形で細胞内に輸送することができる（例えば、Slater, J.E. 他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475; 及び Scanlon, K.J. 他 (1995) 9(13): 1288-1296.を参照）。アンチセンス配列はまた、レトロウイルスまたはアデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターを使って、細胞内に導入することができる（例えば、Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271; Ausubel, 前出; Uckert, W. 及び W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347.を参照）。別の遺伝子輸送機構には、リポソーム由来系、人工ウイルス体膜、または当分野で周知の他の系が含まれる（例えば、Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J. 他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315; 及び Morris, M.C. 他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14) :2730-2736 .を参照）。

【0169】

本発明の別の実施例では、SNEYNをコードするポリヌクレオチドを、体細胞または生殖系列の遺伝子治療に使用可能である。遺伝子治療は、以下の目的のために実施される。1) 遺伝子欠損症の治療の為（例えば、X染色体連鎖遺伝である重度の複合免疫欠損(SVID)-X1疾患 (Cavazzana-Calvo, M. 他 (2000) *Science* 288:669-672)、遺伝性アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に付随する重度の複合免疫不全症候群 (Blaese, R.M. 他 (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C.他 (1995) *Science* 270:470-475)、嚢胞性線維症 (Zabner, J.他 (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G. 他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666; Crystal, R.G. 他 (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703)、サラセミア、家族性高コレステロール血症、第VIII因子及び第IX因子の欠損による血友病 (Crysta

I, R.G. (1995) Science 270:404410; Verma, I.M. 及び Somia, N. (1997) Nature 389:239-242)。2) 条件致死遺伝子産物を発現させる為(例えば、調節不能な細胞増殖による癌の場合)。3) 細胞内の寄生体から保護をするタンパク質を発現させる為(例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)などのヒトレトロウイルス(Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396; Poeschla, E. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399)、B型またはC型肝炎ウイルス(HBV, HCV)、*Candida albicans* 及び *Paracoccidioides brasiliensis*などの真菌寄生体、*Plasmodium falciparum* 及び *Trypanosoma cruzi*などの原虫寄生体に対する保護のため)。SNEYNの発現または調節におけるある遺伝子欠損によって疾患が起こる場合、形質導入されたある好適な細胞集団からSNEYNを発現させることで、遺伝子欠損によって起こる臨床症状を緩和できる。

【0170】

本発明の更なる実施例では、SNEYNの欠損によって起こる疾患や異常症は、SNEYNをコードする哺乳類発現ベクターを作製して、それらのベクターを機械的な方法でSNEYN欠損細胞に導入して治療する。*in vivo* または *ex vitro*の細胞に用いる機械的な移入技術には、1) それぞれの細胞に直接DNAを微量注入する、2) 弾道的な金粒子の輸送、3) リポソームの仲介による形質移入、4) 受容体の仲介による遺伝子移入、5) DNAトランスポゾンの使用が含まれる(Morgan, R.A. 及び W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217; Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. 及び H. Re'cipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)。

【0171】

SNEYNの発現に効果的と思われる発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、及びPTE T-OFF、FTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA)が含まれる。以下のプロモーターを用いて、SNEYNを発現することが可能である。1) 恒常的に活性化プロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ(TK)、または 作用

遺伝子 (-action gene) などからの) 2) 誘導性プロモーター (例えば、テトラサイクリン調節プロモーター (Gossen, M. 及び H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551; Gossen, M. 他 (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. 及び H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456), T-REX plasmid (Invitrogen)が販売)、エクジソン誘導性プロモーター (plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogenが販売)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、RU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター (Rossi, F.M.V. 及び H.M. Blau, 前出))、3) 正常な固体からのSNEXNをコードする内在性遺伝子の天然プロモーターまたは組織特異的プロモーター。

【 0 1 7 2 】

一般的な当業者は、市販のリポソーム形質転換キット (例えば、PERFECT LIPI D TRANSFECTION KIT, Invitrogenが販売) を用いれば、実験パラメーターの最適化にそれほど気を使わなくとも、培養液の標的細胞にポリヌクレオチドを移入することができる。別法では、形質転換をリン酸カルシウム法で行うことができる (Graham, F.L. 及び A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467)、または電気穿孔法 (Neumann, E. 他 (1982) EMBO J. 1:841-845)。一次細胞にDNAを導入する為には、標準的な哺乳類形質移入プロトコルを変更する必要がある。

【 0 1 7 3 】

本発明の別の実施例では、SNEXNの発現に関連した遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、以下のものからなるレトロウイルスベクターを作製して治療できる。1) 独立プロモーターまたはレトロウイルス長末端反復 (LTR) プロモーターの調節の下、SNEXNをコードするポリヌクレオチド。2) 好適なRNAパッケージングシグナル。3) 効率的なベクターの増幅に必要なコード配列及び追加のレトロウイルスシス作動性RNA配列、Rev応答性要素 (RPE: Rev-responsive element)。レトロウイルスベクター (例えば、PFB 及び PFBNE0) は市販されており (Stratagene)、公表された情報 (Riviere, I. 他 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6733-6737) に基づいている。また、これを引用することをもって、本明細書の一部とする。これらベクターは、VSVgなどの乱交雑エンベロープタンパク質または標的細胞上の受容体に対して屈性をもつエンベロープ遺伝子を発

現する、好適なベクター産生細胞株 (VPCL) で増殖される (Armentano, D. 他 (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. 他 (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. 及び A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. 他 (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. 他 (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。Riggによる米国特許第5、910、434号 (「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」) に、レトロウイルスパッケージング細胞株を得る方法が開示され、引用することをもって、本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖方法及び細胞集団 (例えば、CD4⁺T細胞) の形質移入方法、患者に形質移入された細胞を戻す方法は、遺伝子治療の分野では周知の方法である (Ranga, U. 他. (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. 他 (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. 他 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0174】

別法では、アデノウイルスベースの遺伝子治療輸送系を用いて、SNEYNをコードポリヌクレオチドを、SNEYNの発現において1つ以上の遺伝子異常を有する細胞に輸送する。アデノウイルスベースのベクターの作製及びパッケージングは、当業者には周知である。複製欠損アデノウイルスベクターは、免疫調節性タンパク質をコードする遺伝子の無償のランゲルハンス島への移入に対して、可変性である (Csete, M.E. 他 (1995) Transplantation 27:263-268)。有用と思われるアデノウイルスベクターは、Armentanoによる米国特許第5、707、618号 (「Adenovirus vectors for gene therapy」) に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P.A. 他による (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544、及びVerma, I.M.とN. Somiaによる (1997) Nature 18:389:239-242に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0175】

更なる別法では、ヘルペスベースの遺伝子治療輸送系を用いて、SNEYNをコー

ドポリヌクレオチドを、SNEYNの発現において1つ以上の遺伝子異常を有する細胞に輸送する。ヘルペス単一性ウイルス(HSV)ベースのベクターの使用は、HSVが屈性を有するため、中枢神経の細胞にSNEYNを導入する際に特に有用である。ヘルペスベースのベクターの作製及びパッケージングは、当業者には周知である。複製コンピテントヘルペス単一性ウイルス(HSV)の1型ベースのベクターが、霊長類の眼へのレポーター遺伝子の輸送に用いられた(Liu, X. 他. (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製については、DeLucaによる米国特許第5、804、413号(「Herpes simplex virus strains for gene transfer」)に記載され、引用することをもって、本明細書の一部とする。米国特許第5、804、413号は、人間の遺伝子治療などの目的のために、好適なプロモーターの調節の下、ある細胞に形質移入される少なくとも1つの外来性遺伝子を含むゲノムからなる組換えHSV d92の使用について記載している。また、この特許は、ICP4及びICP27、ICP22に対して欠失を引き起こす組換えHSV株の作製及び使用についても記載している。HSVベクターについては、Goins, W.F.他による(1999) *J. Virol.* 73:519-532、及びXu, H.他による(1994) *Dev. Biol.* 163:152-161を参照のこと。また、これらを引用することをもって、本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、及び大きなヘルペスウイルスゲノムの様々なセグメントを含む多数のプラスミドの形質移入の後の組換えウイルスの発生、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、ヘルペスウイルスの細胞への感染については、当業者には周知である。

【0176】

更なる別法では、アルファウイルス(プラスの一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いて、SNEYNをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に輸送する。プロトタイプのアムニオンウイルスであるSemliki Forest Virus (SFV)の生態が広範に研究され、遺伝子移入ベクターはSFVゲノムに基づいていたことがわかった(Garoff, H. 及び K.-J. Li (1998) *Curr. Opin. Biotech.* 9:464-469)。アルファウイルスRNAの複製の間に、サブゲノムRNAが産生され、通常このサブゲノムRNAはウイルス性キャプシドタンパク質をコードする。このサブゲノムRNAが、完全長のゲノムRNAより高いレベルで複製し、酵素活性をもつウイルスタンパク質(例え

ば、プロテアーゼやポリメラーゼ)に較べて過剰なキャプシドタンパク質が産生されることになる。同様に、キャプシドコード領域の代わりにアルファウイルスゲノムにSNEYNのコード配列を移入すると、ベクター移入細胞において多数のSNEYNをコードするRNAが産生され、SNEYNが高いレベルで産生される。通常は、アルファウイルスの感染は、2、3日以内の細胞融解につながるが、ハムスターの正常な腎臓の細胞(BHK-21)への変異Sindbisウイルス(SIN)の持続的な感染が確立できるため、アルファウイルスの溶菌複製を変更して遺伝子治療に使えるようになることを示唆している(Dryga, S.A. 他(1997)Virology 228:74-83)。アルファウイルスの宿主として多様な宿主が使用できるため、様々な細胞型にSNEYNの導入が可能となる。ある集団の細胞のサブセットの特異的な増殖には、増殖の前に細胞の選別が必要であると思われる。感染性のアルファウイルスcDNAクローンの操作方法、及びアルファウイルスcDNA及びRNAの形質移入の方法、アルファウイルス感染の方法については、当業者には周知である。

【0177】

転写開始部位、例えば、開始部位から-10までまたは開始部位から+10までの領域のオリゴヌクレオチドを用いて、遺伝子発現を阻止することが可能である。同様に、三重らせん塩基形成方法を用いて、阻止することもできる。三重らせん構造は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合のために十分に広がるのを阻止するため有用である。三重式DNAを用いる最近の治療の進歩は文献に記載されている(例えば、Gee, J.E. 等.(1994) In: Huber, B.E. 及び B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing, Mt. Kisco, NY, pp.163-177を参照)。相補的な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の翻訳を阻止するように設計できる。

【0178】

酵素性RNA分子であるリボザイムは、RNAの特異的切断を触媒するために用いることができる。リボザイム作用の機構には、相補的な標的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含まれ、ヌクレオチド鎖切断が続く。例えば、SNEYNをコードする配列のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ

効果的に触媒する組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子が含まれる。

【0179】

任意の潜在的RNA標的の中の特異的なリボザイム切断部位が、後続の配列GUA、GUU、及びGUCを含むリボザイム切断部位に対して、標的分子をスキミングすることによって初めに同定される。一度同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15個から20個のリボヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチドの機能を不全にする二次的な構造の特徴について評価することが可能である。候補標的の適合性も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの容易性をテストすることによって評価することが可能である。

【0180】

本発明の相補的なリボ核酸分子及びリボザイムは、当分野で周知の方法を用いて、核酸分子の合成のために作製することができる。これらの方法には、固相ホスホラミダイト化合物などのオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法が含まれる。別法では、RNA分子が*in vitro*及び*in vivo*でSNEXNをコードするDNA配列の転写によって生成され得る、このようなDNA配列はT7またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモータを用いて、種々のベクターの中に組み入れることが可能である。別法では、相補的なRNAを構成的または誘導的に合成するこれらのcDNA作製物は、細胞株、細胞、または組織の中に導入することができる。

【0181】

RNA分子を修飾することによって、細胞内の安定性を高め、半減期を長くすることができる。可能な修飾には、分子の5'及び/または3'端部でのフランキング配列の追加、または分子の骨格内でのホスホジエステラーゼ結合よりむしろホスホチオネート又は2' Oメチルの使用が含まれる、がこれらに限定されるものではない。PNAの生成に固有のこの概念は、内在性の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、及びウリジンのアセチル-、メチル-、チオ-、及び同様の修飾形態だけでなく、イノシン、キューエオシン (queosine)、及びワイプトシン (wybutosine) などの従

来のものでない塩基を含めることによって、これらの分子の全体に拡大することができる。

【0182】

本発明の更なる実施例は、SNEXNをコードするポリヌクレオチドの発現を変えるのに有効な化合物のスクリーニング方法を提供する。特定のポリヌクレオチドの発現を変えるのに効果的な化合物には、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド及びアンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子及び他のポリペプチド転写制御因子、特定のポリヌクレオチド配列と相互作用し得る巨大分子である化学物質が含まれる。効果的な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビター或いはプロモーターとして作用し、ポリヌクレオチドの発現を変える。従って、SNEXNの発現または活性の増大に関連した異常症の治療において、SNEXNをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物は治療に有用であり得、SNEXNの発現または活性の低下に関連した異常症の治療において、SNEXNをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物は治療に有用であり得る。

【0183】

特定のポリヌクレオチド発現の変更の効果性を調べるために、少なくとも1つ或いは複数の試験用化合物をスクリーニングする。ある試験用化合物は、当分野で周知の技術を用いて得ることが可能である。このような技術には、ポリヌクレオチド発現の変更の効果的であるとして知られる化合物の化学修飾と、市販或いは専売のライブラリからの天然または非天然の化学的な化合物の選択と、目的のポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的な特性に基づく化合物の合理的な設計と、組み合わせて或いはランダムに作製された化学的な化合物のライブラリからの選択とが含まれる。SNEXNをコードするあるポリヌクレオチドを含むサンプルを、上記のようにして得られた試験用化合物の少なくとも1つに曝露する。このサンプルは、例えば、無償または透過化処理された細胞、*in vitro*の無細胞系または再構成された生化学系を含み得る。SNEXNをコードするポリヌクレオチド発現の変化は、当分野で周知の任意の方法で検査する。通常は、特定のヌクレオチドの発現は、SNEXNをコードするポリヌクレオチド配列に相補的なヌクレオ

チド配列を含むプローブを用いたハイブリダイゼーションで検出する。ハイブリダイゼーションの量は測定可能であるため、1つ以上の試験用化合物に曝露した場合としない場合のポリヌクレオチドの発現の比較の基準となる。ある試験用化合物に曝露したポリヌクレオチドにおける発現の変化は、試験用化合物がポリヌクレオチドの発現の変更に効果的であることを示唆する。特定のポリヌクレオチドの発現の変更に効果的な化合物のスクリーニングは、例えば、*Schizosaccharomyces pombe* 遺伝子発現系(Arkins, D. 他 (1999) U.S. Patent No. 5,932,435; Amdt, G.M. 他 (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15)、またはHeLa cell (Clarke, M.L. 他 (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13)などのヒト細胞株を用いて行うことができる。本発明のある実施例は、特定のポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性を調べるため、オリゴヌクレオチドの組合せライブラリ(例えば、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、加工オリゴヌクレオチド)のスクリーニングを含む(Bruice, T.W. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,686,242; Bruice, T.W. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,022,691)。

【0184】

ベクターを細胞又は組織に導入する多数の方法が利用でき、*in vivo*、*in vitro*、及び*ex vivo*での使用に等しく適している。*ex vivo*での治療の場合、患者から採取された肝細胞の中にベクターを導入して、自家移植で同じ患者に戻すためにクローニング増殖される。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運搬は、当分野で周知の方法を用いて実行することができる(例えば、Goldman, C.K. 他. (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-66:を参照)。

【0185】

上記したいかなる治療方法も、例えばヒト及びイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サルなどの哺乳動物を含む、治療が必要な全ての被験体に適用できる。

【0186】

本発明の別の実施例は、一般に医薬用に用いることができる賦形剤で調製された活性成分を含む医薬品組成物に関連する。賦形剤には、例えば、糖、澱粉、セ

ルコース、ゴム、タンパク質が含まれ得る。様々な製剤が一般に知られており、最新版のRemington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton P A) に詳しく記載されている。このような医薬品組成物は、SNEYN、SNEYNの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、又はSNEYNのインヒビターなどを含み得る。

【0187】

本発明に用いられる医薬品組成物は、任意の数の経路を用いて投与することもできる。この経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、もく膜下腔内、心室内、肺、経皮性、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、異所性、舌下、または直腸が含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0188】

肺に投与する医薬品組成物は、液体或いは乾燥粉末状が可能である。これらの組成物は、一般には患者が吸引する直前にエアロゾル化される。小分子(例えば、従来の低分子量の有機薬剤)の場合は、肺の肺泡領域を介した肺へのエアロゾル輸送技術の進歩により、インシュリンなどの薬剤を循環血液に輸送することが実質的に可能となった(例えば、Patton, J.S. 他, U.S. Patent No. 5,997,848を参照)。肺輸送は、注射針を使わず投与でき、有毒となり得る浸透促進剤を用いる必要がないという利点がある。

【0189】

本発明に用いる好適な医薬品組成物には、目的を達成するため、効果的な量の活性処方成分を含む組成物が含まれる。当業者は、十分に自分の判断で効果的な服用量を決めることができる。

【0190】

SNEYN又はその断片を含む巨大分子を細胞内に直接輸送するために、医薬品組成物を特殊な形態にした方が良い場合もある。例えば、細胞不透過性の巨大分子を含むリポソーム製剤は、細胞融合を促して、その巨大分子を細胞内に輸送する。別法では、SNEYN又はその断片は、HIV Tat-1タンパク質から短い陽イオンN末端部分に結合し得る。このように生じた融合タンパク質が、マウスのモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に導入されたのが見つかった。

【0191】

どのような組成物であっても、治療に効果的な薬用量は、初めは、例えば腫瘍細胞の腫瘍細胞アッセイで、或いは動物モデルのどちらかで推定することができる。通常、動物モデルには、マウス、ウサギ、イヌ、又はブタなどが用いられる。動物モデルはまた、好適な濃縮範囲及び投与の経路を決めるのに用いることができる。このような治療をもとに、ヒトに好適な薬用量及び投与経路を決定することができる。

【0192】

医学的に効果的な薬用量は、症状や容態を回復させる、たとえばSNEYN又はその断片、SNEYNの抗体、SNEYNのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。薬用有効度及び毒性は、たとえば、 ED_{50} （服用に対して集団の50%に医薬的效果がある。）または LD_{50} （服用に対して集団の50%に致命的である）統計を計算するなど、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決定することができる。治療効果と毒性効果との薬用量比は治療指数であり、 LD_{50} / ED_{50} の比率で示すことができる。高い治療指数を示す医薬品組成物が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータが、ヒトへの適用のために、薬用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薬用量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、 ED_{50} を含む血中濃度の範囲であることが望ましい。薬用量は、用いられる投与形態及び患者の感受性、投与の経路にによって、この範囲内で様々である。

【0193】

正確な薬用量は、治療が必要な患者に関する要素を考慮して、実務者によって決められるであろう。薬用量及び投与は、効果的なレベルの活性成分を与えるため或いは所望の効果を維持するために調節される。薬用量の要素として考慮されるものには、疾患の重症度、患者の一般的な健康状態、年齢、体重、及び患者の性別、投与の時間及び頻度、併用する薬剤、反応感受性、及び治療に対する応答が含まれる。作用器官が長い医薬品組成物は、三日か四日に一度、一週間に一度、二週間に一度、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって左右され、投

与され得る。

【0194】

通常の薬用量は投与の経路によって異なるが、約0.1～100,000 μ gまでの最大約1グラムまでである。特定の薬用量及び運搬の方法に関するガイドランスは文献に記載されており、一般に当分野の実務者はそれを利用することができる。当業者は、タンパク質またはインヒビターとは異なったヌクレオチドの製剤を利用するであろう。同様に、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの運搬は、特定の細胞、状態、位置などに対して特異的であろう。

【0195】

診断

別の実施例では、SNEYNに特異的に結合する抗体が、SNEYNの発現による特徴をもつ疾患の診断、またはSNEYNやSNEYNのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビター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用いられる。診断に有益な抗体は、治療のところで記載した方法と同じ方法で製剤される。SNEYNの診断アッセイには、抗体及び標識を用いてヒトの体液或いは細胞や組織から採取されたものからSNEYNを検出する方法が含まれる。これらの抗体は、修飾をして或いはしないで使用され、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され得る。当分野で周知の種々のレポーター分子が用いられるが、その内の幾つかは上記した。

【0196】

SNEYNを測定するためのELISA, RIA, 及びFACSを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのSNEYNの発現を診断する元となるものを提供する。正常或いは標準的なSNEYNの発現の値は、複合体の形成に適した条件の下、正常な哺乳動物、好ましくはヒトである被験者から採取した体液または細胞とSNEYNに対する抗体とを結合させることによって決定する。標準的な複合体形成の量は種々の方法で定量され得るが、測光法 (photometric) が好ましい。被験者のSNEYNの発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが標準値と比較される。標準値と被験者との間の偏差が、疾患を診断するパラメーターとなる。

【0197】

別の実施例によれば、SNEXNをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用いられるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的なRNA及びDNA分子、及びPNAが含まれる。ポリヌクレオチドを用いて、疾患と関連し得るSNEXNを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出及び定量する。この診断アッセイを用いて、SNEXNの不在、存在、及び過度の発現を調べ、治療中のSNEXNレベルの制御を監視する。

【0198】

ある実施形態では、SNEXNまたは近縁の分子をコードする遺伝子配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、SNEXNをコードする核酸配列を同定することが可能である。例えば5'調節領域である高度に特異的な領域か、例えば保存されたモチーフであるやや特異性の低い領域から作られているかのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅の厳密性(最大、高い、中間、または低い)は、プローブがSNEXNをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いはアレルや関連配列コードする自然界の配列のみを同定するかどうかによって決まるであろう。

【0199】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、SNEXNをコードする任意の配列と50%以上の同一性を有することもある。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNA或いはRNAを用いることが可能であり、SEQ ID NO:3-4の配列、或いはSNEXN遺伝子のプロモーター、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。

【0200】

SNEXNをコードするDNAに対して特異的なハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、SNEXN及びSNEXN誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をmRNAプローブの作製のためのベクターにクローニングする方法がある。このようなベクターは市販されており、当業者には周知であり、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る。ハイブリダイゼーションプローブは、

例えば32P或いは35Sなどの放射性核種、或いはアビジン/ビオチン (biotin) 結合系によってプローブに結合されたアルカリホスファターゼなどの酵素標識等の種々のレポーターの集団によって標識され得る。

【0201】

SNEXNをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、SNEXNの発現に関連する疾患を診断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、免疫異常症が含まれ、その中には、炎症、日光性角化症、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 及び副腎機能不全、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、動脈硬化、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、気管支炎、滑液包炎、胆嚢炎、硬変、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、胎児赤芽球症、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、発作性夜間血色素尿症、肝炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、混合型結合組織病 (MCTD)、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋又は心膜炎症、骨髓線維症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、真正赤血球増加症、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、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、原発性血小板血症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、リンパ腫及び白血病、骨髓腫を含む造血性の癌、外傷が含まれ、また、神経疾患も含まれ、その中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及び他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化症及び他の運動ニューロン疾患、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、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、クールー及びクロイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、Gerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含むプリオン病 (prion disease) と、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫 (cerebelloretinal h

emangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、中枢神経系性精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症(neuroskeletal disorder)、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィー及び他の神経筋障害、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性及び代謝性、内分泌性の中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分性及び不安性の分裂病性障害を含む精神障害と、季節性感情障害(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、妄想性精神病、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、進行性核上性麻痺、皮質基底変性症(corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭痴呆が含まれ、また、胃腸疾患もあり、その中には、食道炎、食道癌、胃炎、胃癌、炎症性腸疾患、胆嚢炎、腸管の炎症、膵臓炎、膵臓癌、硬変、肝炎、ヘパトーム、大腸炎、結腸癌、クローン病が含まれ、また、遺伝障害も含まれ、その中には、副腎白質ジストロトフィ、アルポート症候群、コロイデレミア、デュシェンヌ-ベッカー型筋ジストロフィ、ダウン症候群、嚢胞性線維症、慢性肉芽腫症、ゴーシェ病、ハンチントン病、マルファン症候群、筋ジストロフィ、筋緊張性異栄養、頻繁骨形成不全(pycnodysostosis)、レフサム症候群、網膜芽腫、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ウェルナー症候群、フォン ウィルブランド病、ウィルムス腫瘍、ツェルヴェーガー症候群、ペルオキシソームアシル-CoA酸化酵素欠損症(peroxisomal acyl-CoA oxidase deficiency)、ペルオキシソームチオラーゼ欠損症、ペルオキシソーム2官能タンパク質欠損症、ミトコンドリアカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ及びカルニチン欠損症、ミトコンドリア超長鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア短鎖アシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症、ミトコンドリア電子伝達フラボタンパク質及び電子伝達フラボタンパク質：ユビキノンオキシドレダクターゼ欠損症、ミトコンドリア3官能タンパク質欠損症、ミトコンドリア短鎖3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症が含まれ、また、平滑筋異常も含まれ、その中には、口峽炎、アナフィラキシー、不整脈、喘息、心血管ショック、クッシング症候群、高血圧、低血糖症、心筋梗塞、片頭痛、褐色細胞腫と、心筋症及び脳症、癲癇、カーンズ セイヤ症候群、乳酸アシドーシス、筋クローヌス性障害、眼筋麻痺、ここで、平滑筋には血管、胃腸管、心臓、子宮などが含まれ、更に細胞増殖

異常症が含まれ、その中には、日光性角化症及び動脈硬化、アテローム性動脈硬化、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、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髓腫、肉腫、及び奇形癌、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、子宮の癌などが含まれる。SNEYNをコードするポリヌクレオチド配列は、サザンブロット法やノーザンブロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法、ディップスティック(dipstick)、ピン(pin)、ELISA型アッセイ、または患者から採取した体液或いは組織を利用して変異SNEYNの発現の検出に用いられるマイクロアレイに使用することが可能である。このような質的或いは量的方法は、当分野では周知である。

【0202】

特定の形態において、SNEYNをコードするヌクレオチド配列は、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有用であろう。SNEYNをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件の下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。好適な培養期間の後、サンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が、制御サンプルと較べて著しく変わっている場合は、サンプル内のSNEYNをコードするヌクレオチド配列の変異レベルにより、関連する疾患の存在が明らかになる。このようなアッセイを用いて、動物実験、臨床試験、或いは個人の患者の治療を監視における、特定の治療効果を推定することが可能である。

【0203】

SNEYNの発現に関連する疾患の診断の元となるものを提供するために、正常あるいは標準的な発現の概要が確立される。この確立は、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件の下、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、SNEYNをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な被験者

から得た値と周知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが用いられる実験からの値とを比較することによって定量可能である。正常なサンプルから得た標準的な値を、疾患の症状を示す被験者から得た値と比較可能である。標準値と被験者の値との偏差を用いて疾患の存在を確定する。

【0204】

疾患の存在が確定され治療プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返して、被験者における発現のレベルが正常な患者に示される値に近づき始めたかどうかを推定することが可能である。繰り返し行ったアッセイの結果を、数日から数ヶ月の期間の治療の効果を見るのに用いることができる。

【0205】

癌において、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過剰な発現または過少の発現のどちらか）の存在は、疾患の発生の素因を示し、また実際に臨床的症状が出る前に疾患を検出する方法を提供することが可能である。この種により明確な診断により、医療の専門家が予防方法或いは積極的な治療法を早くから利用して、癌の発生または進行を防ぐことが可能となる。

【0206】

SNEXNをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断への利用には、PCRの利用が含まれ得る。このようなオリゴマーは、化学的な合成、酵素を用いた生成、或いは*in vitro*で生成され得る。オリゴマーは、好ましくはSNEXNをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはSNEXNをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件の下、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩い厳密性条件の下、近縁のDNA或いはRNA配列の検出及び/または定量のため用いることが可能である。

【0207】

ある実施形態では、SNEXNをコードするポリヌクレオチドからのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、一ヌクレオチド多型（SNP：single nucleotide polymorphism）を検出することが可能である。SNPIは、遺伝的或いは後天的な遺伝病

によってよく起こる置換、挿入、欠失である。SNPの検出方法には、限定するものではないが、一本鎖コンフォメーション多型 (SSCP:single-stranded conformation polymorphism) 法や蛍光SSCP (fSSCP) 法がある。SSCPでは、SNEXNをコードするポリヌクレオチドからのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCR法で増幅する。DNAは、例えば、病変組織或いは正常な組織、生検サンプル、体液などに由来する。DNA内のSNPによって、一本鎖型のPCR産物の二次及び三次構造に違いが生じ、この違いを非変性ゲルにおけるゲル電気泳動法で検出する。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光標識し、それによってDNA配列機などの高スループットの装置でのamplimerの検出が可能になる。更に、コンピュータSNP (isSNP) と呼ばれる配列データベース分析法で、共通のコンセンサス配列に構築される個々の重複DNA断片の配列を比較して、多型を同定できる。これらのコンピュータベースの方法は、統計的モデルを用いた実験室でのDNAの準備及びシーケンシングのエラー、及びDNA配列クロマトグラムの自動分析による配列の変異をフィルタをかけて取り除く。別法では、SNPは、例えば、高スループットMASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析法によって、SNPが検出されて特徴付けられる。

【0208】

SNEXNの発現を定量するために用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識或いはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification)、及び標準的な曲線に結果が加えられたものが含まれる (例えば、Melby, P.C.等(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-44; Duplaa, C.等(1993) Anal. Biochem. 229-236を参照)。多数のサンプルの定量の速度が、目的のオリゴマーまたはポリヌクレオチドが種々の希釈液に含まれ、分光光度法或いは非色応答により迅速に定量する高スループット型のアッセイを用いることによって加速された。

【0209】

別の実施例では、本明細書に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それより長い断片を、マイクロアレイにおける要素として用いる。Seilhamer, J.J. 他による米国特許第5,840,484号、名称「Comparative Gene Transcript Analysis」に記載されているように、同時に極めて多くの

遺伝子の相対発現レベルを監視する転写イメージ技術にマイクロアレイを用いることができる。この特許を引用することをもって、本明細書の一部とする。また、マイクロアレイを、遺伝的変異体、突然変異、多型の同定に用いることが可能である。この情報は、遺伝子機能の決定、及び疾患の遺伝的根拠の解釈、疾患の診断、遺伝子発現による疾患の進行/退行の監視、疾患の治療薬剤の開発及び治療薬の活性の監視に有用である。具体的には、この情報を用いて、患者にとって最も適切かつ効果的な治療方法を選択するために、患者の薬理ゲノミクスプロフィールを作成する。例えば、患者の薬理ゲノミクスプロフィールに基づいて、その患者にとって極めて効果的かつ副作用の少ない治療薬が選択される。

【0210】

別の実施例では、SNEYNに特異的な抗体、またはSNEYNやその断片を、マイクロアレイの要素に用いることが可能である。また、上記したようなタンパク質間の相互作用、または薬剤と標的の相互作用、遺伝子発現プロフィールの監視や測定にマイクロアレイを用いることが可能である。

【0211】

当分野で周知の方法でマイクロアレイを準備して使用し、分析する（例えば、Brennan, T.M. 他 (1995) 米国特許第5,474,796号; Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:10614-10619; Baldeschweiler 他 (1995) PCT出願番号W095/251116; Shalon, D. 他 (1995) PCT出願番号W095/35505; Heller, R.A. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:2150-2155; 及び Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが周知であり、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, Londonに全て記載されており、引用することをもって本発明の一部とする。

【0212】

本発明の別の実施例ではまた、SNEYNをコードする核酸配列を用いて、自然発生のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製することが可能である。コード配列或いは非コード配列のどちらかを用いるが、場合によっては、コード配列より非コード配列の方が好ましい。例えば、多

遺伝子ファミリーメンバー間のコード配列の保存は、染色体マッピング中に好ましくないクロスハイブリダイゼーションが起こる可能性がある。この配列は、以下のものに対してマッピングされる。特定の染色体、染色体の特定領域または人工生成の染色体、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 生成物或いは単一染色体 cDNA ライブラリである (例えば、Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134; 及び Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154. を参照)。一度マッピングされれば、本発明の核酸配列を用いて、例えば、ある病態の遺伝と特定の染色体領域または制限断片長多型 (RFLP) の遺伝とが相関性を有する遺伝連鎖マップを作成可能である (Lander, E.S. 及び D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357)。

【0213】

In situ蛍光ハイブリダイゼーション (FISH) は、他の物理的染色体マッピング技術及び遺伝マップデータと相関するであろう (例えば、Heinz-Ulrich, 他による (1995) in Meyers, 前出, pp. 965-968. を参照)。遺伝子マップデータの例は、種々の科学誌あるいは Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトで見付けることができる。物理的なマップ上の SNEYN 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、このような疾患と関係する DNA 領域を特定するのに役立つ、位置クローニングが容易になる。本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者と、保有者、及び感染した者との遺伝子配列における違いを検出することもある。

【0214】

染色体標本の In situハイブリダイゼーション、及び確定した染色体マーカーを用いた結合分析などの物理的マッピング技術を用いて、遺伝子マップを拡張することもできる。マウスなどの別の哺乳動物の染色体上での遺伝子の配置により、たとえ特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていなくても、関連するマーカーが明らかになることが多い。この情報は、位置クローニング或いは別の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患の研究をしている研究者にとって価値がある。疾患や症候群に關与するの遺伝子または複数の遺伝子の位置が、遺伝子連鎖によ

て、例えば血管拡張性失調症の11q22-23などの特定のゲノム領域であると大まかに決定されると、その領域に対するどの配列マッピングも関連する遺伝子或いは調節遺伝子を表し、さらなる調査に有用である（例えば、Gatti, R.A.他による（1988）Nature 336:577-580を参照）。また、本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者、保有者、または感染者の間の、転位置、反転などによる染色体位置の違いを検出することも可能である。

【0215】

本発明の別の実施例では、SNEYN、その触媒作用断片或いは免疫原断片またはそのオリゴペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。このようなスクリーニングに用いる断片は、溶液に遊離、固体支持物に固定、細胞の表面上に保持、或いは細胞内に存在する。SNEYNとテストされる薬剤との複合体を結合することによる形成は計測されることもある。

【0216】

薬剤スクリーニングに用いる別の方法は、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のスクリーニング処理能力を高めるために用いられる（例えば、Geysen,他による(1984) PCT出願番号 W084/03564を参照）。この方法では、多数の異なる小さな試験用化合物が固体基板上に合成される。試験用化合物は、SNEYN、或いはその断片と反応してから洗浄される。次に、結合したSNEYNが、当分野で周知の方法で検出される。精製されたSNEYNはまた、前記した薬剤をスクリーニングする技術に用いられるプレート上で直接被覆することもできる。別法では、非中和抗体を用いて、ペプチドを捕らえ、固体支持物に固定することもできる。

【0217】

別の実施例では、SNEYNと結合可能な中和抗体がSNEYNと結合するため試験用化合物と特に競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では、抗体が、SNEYNと1つ以上の抗原決定因子を共有するどのペプチドの存在も検出する。

【0218】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にSNEXNをコードするヌクレオチド配列を用いて、限定はされないが、現在知られているトリプレット暗号及び特異的な塩基対相互作用などのヌクレオチド配列の特性に依存する新しい技術を提供することができる。

【0219】

当分野の技術者であれば、更なる説明がなくても前述の説明だけで十分に本発明を利用できるであろう。したがって、以下に記載する特定の実施例は、例示目的であって本発明を限定するものではない。

【0220】

前出及び以下に記載した全ての特許出願及び特許、刊行物、特に米国出願第60/136、740号及び米国出願第60/139、566号を引用することをもって本明細書の一部とする。

【0221】

【実施例】

1 cDNAライブラリの作製

RNAにはClontech社から購入したものと、表4に列記した組織から単離したものがある。ある組織を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。一方で別の組織をホモジナイズしてフェノールに溶解するか、或いはTRIZOL (Life Technologies)、グアニジニウムイソチオシアネート及びフェノールの単相溶液などの好適な変性剤の混合液に溶解した。この溶解物を塩化セシウムにおいて遠心分離またはクロロホルムで抽出した。イソプロパノール或いは酢酸ナトリウムのどちらかとエタノール、或いは別の方法でこの溶解物からRNAを沈殿させた。

【0222】

RNAの純度を高めるために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、DNA分解酵素でRNAを処理する。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子(Promega)またはOLIGOTEXラテックス粒子(QIAGEN, Chatsworth CA)、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、POLY(A)PURE mRNA精製キット(Ambion,

Austin TX)などの別のRNA単離キットを用いて組織溶解物から直接単離した

。

【0223】

ある場合には、Stratagene社にRNAを提供しStratagene社が対応するcDNAライブラリを作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)またはSUPERSCRIPTプラスミドシステム(Life Technologies)を用いて当分野で公知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成してcDNAライブラリを作製した。(例えば、Ausubel, 1997, 前出, ユニット5.1-6.6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に結合させてから、好適な1つの制限酵素或いは複数の制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリでは、SEPHACRYL S 1000またはSEPHAROSE CL2B、SEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、アガロースゲル電気泳動法によってcDNAの大きさ(300~1000bp)を選択した。PBLUESCRIPTプラスミド(Stratagene)またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)、pcDNA2.1プラスミド(Invitrogen, Carlsbad CA)、pINCY (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)などの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cDNAを結合させた。この組換えプラスミドを、Stratagene社のXL1-Blue, XL1-BlueMRF、SOLR、またはLife Technologies社のDH5 またはDH 10B、ElectroMAX DH 10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

【0224】

2 cDNAクローンの単離

本実施例1に示したように取得したプラスミドは、UNIZAPベクター系(Stratagene)または細胞融解でin vivoで切断して、宿主細胞から回収した。UNIZAPベクターシステム(Stratagene)或いは細胞溶解を利用して、in vivo切除によって宿主細胞からプラスミドを回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、及びAGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid、QIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、REAL Prep 96プラスミド精製キットの内の少なくとも

も1つを用いてプラスミドを精製した。沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4℃で保管した。

【0225】

別法では、高スルーブットの直接結合PCR法によっ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を単一反応混合液で行った。サンプルを処理してから384-ウエルプレートに移して保管し、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)を用いて蛍光定量的に測定した。

【0226】

3 シークエンシング及び分析

シークエンシングのためのcDNAの準備には、ABI CATALYST 800 (Perkin-Elmer)またはHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific)、MICROLAB 2200システム(Hamilton)をPTC-200 thermal cyclers (MJ Research)と共に用いた。cDNAのシークエンシングには、ABI PRISM 373または377シークエンシングシステム(Perkin-Elmer)及び標準ABIプロトコル、塩基対呼び出しソフトウェア、キットを用いた。別法では、cDNAのシークエンシングには、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Molecular Dynamics)を用いた。更なる別法では、cDNAの増幅及びシークエンシングにABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(Perkin-Elmer)を用いた。また、更なる別法では、cDNAのシークエンシングにAmersham Pharmacia Biotech社の溶液と色素を用いた。cDNA配列の読み枠は、標準的な方法(Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7を再度参照)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、本実施例の5に記載した方法で延長した。

【0227】

cDNAのシークエンシングから得たポリヌクレオチド配列の構築及び分析は、当分野の技術者に既知のアルゴリズムを利用したソフトウェアを組合せて行った。表5は、利用したツールまたはソフトウェアのプログラム名、プログラムの

説明、引用文献、閾値パラメーターの要約である。表5の第1の列は用いたツール及びプログラム、アルゴリズムであり、第2の列はそれらの簡単な説明であり、第3の列は好適な引用文献であって、引用することでその全てを本明細書の一部とし、第4の列は2つの配列の一致度の評価に用いたスコア及び確率値、他のパラメータである(スコアが高ければ高いほど2つの配列間の相同性が高くなる)。配列の分析には、MACDNASIS PROソフトウェア(Hitachi Software Engineering, S. San Francisco CA)及びLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いた。ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列のアラインメントは、アラインメント配列間のパーセント同一性を計算するMEGALIGN マルチシーケンスアラインメントプログラム(DNASTAR)に組込まれたクラスターアルゴリズムによって決定されたデフォルトパラメーターを用いて作成された。

【0228】

ポリヌクレオチド配列の確証は、BLAST及び動的計画法、ジヌクレオチド最近接分析に基づいたプログラム及びアルゴリズムを用いて、ベクター及びリンカー、ポリA配列を取り除き、あいまいな塩基対をマスクすることで行った。次に、BLAST及びFASTA、BLIMPSに基づいたプログラムを用いて、公共のデータベースであるGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳類、脊椎動物、真核生物のデータベースやBLOCKS及びPRINTS、DOMO、PRODOM、PFAMデータベースなどのデータベースに対してこれらの配列を問合わせて注釈を得た。Phred及びPhrap、Consedに基づいたプログラムを用いて完全長のポリヌクレオチド配列の中にこれらの配列を構築して、BLAST及びFASTA、BLIMPSに基づいたプログラムでオープンリーディングフレームのためにスクリーンした。完全長のポリヌクレオチド配列を翻訳して対応する完全長のアミノ酸配列を引き出し、GenBankデータベース(上記)及びSwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMなどのデータベース、及びPFAMなどのHidden Markov Model (HMM)に基づいたタンパク質ファミリーデータベースに対して問合わせてこれらの完全長の配列を分析した。HMMは、確率を利用して遺伝子ファミリーのコンセンサス一次構造を解析する(例えば、Eddy, S.R. (1996) *Cur. Opin. Str. Biol.* 6:361-365.を参照)。

【0229】

完全長のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:3 - 4からのポリヌクレオチド配列の断片の同定にも使用できる。約20から4000までのヌクレオチドの断片はハイブリダイゼーション及び増幅に有用であり、上記の発明で説明した。

【0230】

4 ノーザン分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織からのRNAが結合されている膜への標識されたヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを伴う(例えば、Sambrook, 前出, 7章; 及び Ausubel, F.M. 他、前出, 4章及び16章を参照)。

【0231】

B L A S Tに用いる類似のコンピュータ技術を用いて、GenBank或いはLIFESEQデータベース (Incyte Genomics) のようなヌクレオチドデータベース内の同一或いは関連する分子を検索する。この分析は多くの膜系ハイブリダイゼーションより非常に速度が速い。さらにコンピュータ検索の感度を変更して、任意の特定の一一致が、厳密な一致或いは相同的一致の何れかとして分類されるかを確定することができる。検索の基準は、

$(\% \text{最大BLASTスコア} \times \% \text{同一性}) / 5 \times \text{最小}\{\text{長さ(配列番号1)}, \text{長さ(配列番号2)}\}$

として定義される積スコアである。積スコアは、2つの配列間の類似性の程度及び一致する配列の長さの両方を考慮している。また、積スコアは、0から100に規準化された値であり、以下の方法によって求められる。BLASTスコアに%ヌクレオチド同一性を乗じて、(2つの配列の短い方の長さ×5)で除す。BLASTスコアは、高スコアセグメントの組(HSP:high-scoring segment pair)における一致する各塩基対に5ポイント与え、各不一致には-4ポイント与えて計算する。2つの配列が、1つ以上のHSP(ギャップによって分けられる)を示すこともある。HSPが1つ以上の場合、最も高いBLASTスコアをもつ組を用いて積スコアを計算する。積スコアは、部分的な重複とBLASTアラインメントにおける同一性とのバランスである。例えば、積スコア100は、比較した

2つの配列の内の短い方の配列が、その全長に亘って100%同一である場合にのみ得られる。積スコア70は、100%の同一性であって重複部分が70%であるか、或いは88%の同一性であって重複部分が100%である場合に得られる。積スコア50は、100%の同一性であって重複部分が50%であるか、或いは79%の同一性であって重複部分が100%である場合に得られる。

【0232】

ノーザン分析の結果は、SNEXNをコードする転写物が発生したライブラリの分布割合として報告される。分析には、器官/組織及び疾患によるcDNAライブラリの分類も含まれる。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、泌尿が含まれる。疾患のカテゴリーには、癌、炎症、外傷、細胞増殖、神経、貯留(pooled)が含まれる。それぞれのカテゴリーについて、目的の配列を発現するライブラリの数を数えて、それを全ての範囲のライブラリの数で割った。各組織に特異的に発現する割合(パーセント)と各疾患で発現する割合を表3に示した。

【0233】

5 SNEXNをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:3-4を構築するために用いられるcDNA配列を、BLAST及び他のSmith-Watermanアルゴリズムを装備するものを用いて、IncyteのLIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:3-4と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap (表5)などの構築アルゴリズムを用いて、隣接して重複する配列のクラスターの中に組み入れた。Stanford Human Genome Center (SHGC)及びWhitehead Institute for Genome Research (WIGR)、GeneThonなどの公共の機関から入手できる放射線ハイブリッド (radiation hybrid) 及び遺伝子マッピングデータを用いて、クラスター配列が以前にマッピングされたかどうかを調べることができる。クラスターに既にマッピングされた配列を含む場合は、その特定のSEQ ID NO: (配列番号)を含むクラスターの全ての配列が、そのマップ位置に割当てられる。

【0234】

SEQ ID NO:3及びSEQ ID NO:4の遺伝子マップ位置は、ヒト染色体の範囲または

間隔として、本明細書に記載する。センチモルガン単位の間隔のマップ位置を、染色体のpアーム (p-arm) の末端に対して測定する。センチモルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づいた測定値の単位である。平均すると、1 cMは、DNAの1 Mbに概ね等しいが、組換えのホットスポット及びコールドスポットによって大きく変化し得る。このcM距離は、配列が各クラスターに含まれる放射線ハイブリッドマーカーの範囲を決定できるGene'ne'thonによってマッピングされた遺伝子マーカーに基づく。示した間隔内の位置にある公共及びインサイトの配列に関連する疾患は、該当するものは本明細書に記載されている。

【0235】

6 SNEXNをコードするポリヌクレオチドの延長

SEQ ID NO:3 - 4の完全長の核酸配列は、完全長分子の好適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その完全長分子の好適な断片を延長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の延長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の延長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは他の適切なプログラムを用いて、約22個から約30個のヌクレオチドの長さで約50%以上のGC含量を有し、かつ約68~72の温度で標的配列にアニールするように設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体が生じないようにヌクレオチドを延長した。

【0236】

選択されたヒトcDNAライブラリーを用いてこの配列を延長した。2段階以上の延長が必要な場合、若しくは望ましい場合は、追加或いはネスト化プライマーの組を設計する。

【0237】

当分野で既知の方法を利用したPCR法で高い忠実度で増幅した。PCRはPTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.)用いて96ウェルブロックプレートで行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ とβ-メルカプトエタノールを含む緩衝液、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE酵素 (Life Technologies)、Pfu DNAポ

リメラーゼ(Stratagene)を含む。プライマーの組、PCI AとPCI Bに対して以下のパラメーターで増幅を行った。

- ステップ1 94 で3分間
- ステップ2 94 で15秒
- ステップ3 60 で1分間
- ステップ4 68 で2分間
- ステップ5 ステップ2及び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 で保管

別法では、プライマーの組、T7とSK+に対して以下のパラメーターで増幅を行った。

- 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及び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 で保管。

【0238】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5 µlの希釈していないPCR産物に溶解した100 µlのPICOGREEN定量試薬(0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR)を不透明な蛍光光度計プレート(Coming Costar, Acton MA)の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定する。このプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)でスキャンして、サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量化する。反応混合物の5~10 µlのアリコットを1%のアガロースミニゲル上での電気泳動によって解析し、何れの反応物が配列を延長することに成功したかを決定する。

【0239】

延長したヌクレオチドを脱塩及び濃縮してから384ウェルのプレートに移し

、CviJIコレラウィルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)で消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結する前に音波処理またはせん断を行った。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に分離して断片を切断し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化した。T4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いて延長したクローンをpUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で制限部位の伸び出しを処理して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選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37℃で一晩培養した。

【0240】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)及びPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。

- ステップ1 94℃で3分間
- ステップ2 94℃で15秒
- ステップ3 60℃で1分間
- ステップ4 72℃で2分間
- ステップ5 ステップ2及び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℃で保管。

上記したようにPICOGREEN試薬(Molecular Probes)でDNAを定量化した。DNA回収率の悪いサンプルは、上記した条件で再び増幅した。サンプルを20%のジメチルサルホサイド(dimethylsulphoxide)(1:2, v/v)で希釈し、DYENAMIC DIRECTキット(Amersham Pharmacia Biotech)またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(Perkin-Elmer)を用いてシーケンシングした。

【0241】

同様に上述の手順で、SEQ ID NO:3-4のヌクレオチド配列を利用し、この延長のために設計したオリゴヌクレオチドと好適な遺伝子ライブラリを用いて5調

節配列を得た。

【0242】

7 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用

SEQ ID NO:3 - 4から導き出されたハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノムDNA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すが、より大きなcDNAフラグメントの場合でも基本的に同じ手順を用いる。オリゴヌクレオチドを、OLIG 04.06ソフトウェア (National Bioscience) のような最新式のソフトウェアを用いてデザインし、50 pmolの各オリゴマーと、250 µCiの[³²P]アデノシン三リン酸 (Amersham, Chicago, IL) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを組み合わせることで用いることにより標識する。標識されたオリゴヌクレオチドを、Sephadex™ G-25超精細排除デキストランビードカラム (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI) を用いて実質的に精製する。毎分10⁷カウントの標識されたプローブを含むアリコットを、次のエンドヌクレアーゼ、AseI, Bgl II, EcoRI, Pst I, XbaI 或いはPvuII (DuPont NEN) の1つを用いて切断したヒトゲノム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用いる。

【0243】

各切断物からのDNAを、0.7%アガロースゲル上で分画して、ナイロン製メンブラン (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に転写する。ハイブリダイゼーションは40℃で16時間かけて行う。非特異的シグナルを取り除くため、プロットを、段階的に厳密性が増す条件で最大0.1xクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムまで順次室温にて洗浄する。オートラジオグラフィーまたは別のイメージ化方法を用いて、ハイブリダイゼーションパターンを視覚的に比較する。

【0244】

8 マイクロアレイ

マイクロアレイ上のアレイ要素の結合または合成は、フォトリソグラフィー、圧電印刷 (インクジェット印刷、例えば、前出のBaldeschweilerを参照)、機械

式微小スポット (mechanical microspotting) 技術、またはそれらから派生した方法で行うことができる。前記したそれぞれの技術に用いられる基板は、表面に孔のない均一な固体が望ましい (Schena (1999)、前出)。好適な基板には、シリコン及びシリカ、ガラススライド、ガラスチップ、シリコンウエハが含まれる。別法では、熱またはUV結合方法、または化学的或いは機械的な結合方法を利用して、ドット或いはスロットプロットに類似の方法で、基板の表面に要素を配列して結合することが可能である。典型的なアレイは、当分野で周知の方法で作製でき、任意の好適な数の要素を含み得る (例えば、Schena, M. 他 (1995) Science 270:467-470; Shalom D. 他 (1996) Genome Res. 6:639-645; Marshall, A. 及び J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31を参照)。

【0245】

完全長のcDNA、発現遺伝子配列断片 (EST)、またはそれらの断片や誘導体は、マイクロアレイの要素として用いることが可能である。ハイブリダイゼーションに好適な断片やオリゴヌクレオチドは、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) などの当分野で周知のソフトウェアを用いて、選択することができる。アレイ要素は、生物学的サンプルのヌクレオチドとハイブリダイズする。検出を容易にするために、この生物学的サンプルのヌクレオチドには、蛍光標識や他の分子タグを取り付ける。ハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイズしなかったサンプルのヌクレオチドを取り除き、蛍光スキャナーを用いて各アレイ要素のハイブリダイゼーションを検出する。別法では、レーザー着脱及び質量分析法でハイブリダイゼーションを検出する。マイクロアレイ上の要素とハイブリダイズした各ポリヌクレオチドの相補性及び相対存在量の程度を調べる。ある実施例におけるマイクロアレイの準備及び使用方法を以下に記載する。

【0246】

組織サンプルまたは細胞サンプルの準備

グアニジニウムチオシアネート法で、全RNAを組織サンプルから単離し、オリゴ(dT)セルロース法でポリ(A)⁺RNAを精製する。MMLV逆転写酵素及び0.05 pg/ μ lのオリゴ(dT)プライマー(21 mer)、1 X 一次一本鎖緩衝液 (first strand buffer)、0.03 units/ μ lのRNA分解酵素インヒビター、500 μ MのdATP、500 μ Mのd

GTP、500 μ MのdTTP、40 μ MのdCTP、40 μ MのdCTP-Cy3(BDS)またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて、各ポリ(A)⁺RNAサンプルを逆転写する。200 ngのポリ(A)⁺RNAを含む25 mlの中でGEMBRIGHTキット (Incyte) を用いて、逆転写酵素反応をさせた。in vitroでの転写で、非コード酵母ゲノムDNAから特定の調節ポリ(A)⁺RNAを合成する。37 °Cで12時間インキュベートした後、各反应用サンプル(或るものはCy3標識、別のものはCy5標識)を、2.5 mlの0.5 Mの水酸化ナトリウムで処理してから、85 °Cで20分間インキュベートして、反応を止めてRNAを分解する。2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム(CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA)を用いてサンプルを精製し、結合させた後、1 mlのグリコーゲン(1 mg/ml)及び60 mlの酢酸ナトリウム、300 mlの100%エタノールを用いて両方の反応サンプルをエタノール沈殿させる。次に、SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY)を用いてサンプルを乾燥させ、14 μ lの5X SSC/0.2% SDSで再懸濁する。

【0247】

マイクロアレイの準備

本発明の配列を用いてアレイ要素を作製する。各アレイ要素は、クローン化cDNA挿入断片を有するベクターを含む細菌細胞から増幅する。アレイ要素は、初めは1~2 ngでPCRを開始し、30回目の最後には5 μ gより多い量まで増幅する。次に、SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて、増幅したアレイ要素を精製する。

【0248】

精製したアレイ要素をポリマーコートしたガラススライド上に固定する。処理と処理の間及び処理の後、ガラス顕微鏡スライド(Corning)を、0.1%のSDS及びアセトン、多量の蒸留水を用いて超音波洗浄を行う。ガラススライドは、4%のフッ化水素酸(VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA)でエッチング処理し、多量の蒸留水で洗浄し、0.05%のアミノプロピルシラン(Sigma)を含む95%エタノールで被覆する。被覆したスライドを110 °Cのオーブンで硬化させる。

【0249】

アレイ要素を、米国特許第5、807、522号に記載の方法で、被覆したガラス基板に塗る。またこの特許を引用することをもって本明細書の一部とする。平均密度が100 ng / μ lである1 μ lのアレイ要素DNAを、高速のロボット装置でオープンキャピラリープリンティング要素の中に入れる。次にこの装置は、約5 n lのアレイ要素サンプルを各スライドにのせる。

【0250】

マイクロアレイを、STRATALINKER UV-架橋結合 (Stratagene)を用いてUV-架橋結合させる。次に、マイクロアレイを、室温で、0.2%のSDSで1回洗浄し、蒸留水で3回洗浄する。非特異的な結合部位は、0.2%のカゼインを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA)の中で60 で30分間インキュベートして遮断する。次に、0.2%のSDSを含む蒸留水で前記したように洗浄する。

【0251】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応は、それぞれ0.2 μ gのCy3及びCy5で標識したcDNA合成産物を含み、5 X SSC、0.2%のSDSハイブリダイゼーション緩衝液からなる9 μ lのサンプル混合液を含む。このサンプル混合液を65 で5分間加熱して、マイクロアレイの表面に文注し、1.8 cm²のオーバースリップで覆う。このアレイを、顕微鏡スライドより僅かに大きいキャビティを有する防水性のチャンバーに移す。チャンバーの角に140 μ lの5 X SSCを加えて、このチャンバーを湿度100%に保つ。アレイを含むチャンバーを、60 で6.5時間インキュベートする。このアレイを、まず一次洗浄緩衝液(1X SSC, 0.1% SDS)を用いて45 で10分間洗浄し、次に二次洗浄緩衝液を用いて45 で10分間3回洗浄し、最後に乾燥させる。

【0252】

検出

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体を、Cy3及びCy5をそれぞれ励起する488 nm及び632 nmのスペクトル線を生成できるInnova 70 混合ガス

10 W レーザー (Coherent, Inc., Santa Clara CA) を備えた顕微鏡で検出する。20X 顕微鏡レンズ (Nikon, Inc., Melville NY) を用いて、この励起レーザー光をアレイ上にあてる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御される X - Y ステージ上に設置し、レンズを通してラスタースキャンする。本発明の実施例に用いる 1.8 x 1.8 cm のアレイを、解像度 20 μm でスキャンする。

【0253】

異なった2つのスキャンをする場合には、混合ガスマルチラインレーザーは、2つのフルオロフォアを連続して励起する。波長に基づいて放出された光が、2つのフルオロフォアに対応する2つの光電子増倍管検出器 (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) に分かれる。アレイと光電子増倍管検出器との間に好適に配置されたフィルターを用いて、シグナルをフィルタリングする。用いられるフルオロフォアの最大発光は、565 nm が Cy3 であり、650 nm が Cy5 である。各アレイを通常は2回スキャンする。この装置は、同時に両方のフルオロフォアからのスペクトルを記録できるが、レーザー光源における好適なフィルタを用い、1つのフルオロフォアにつき1回スキャンする。

【0254】

周知の濃度でサンプル混合液に加えられるあるcDNA調節種によって発生するシグナルの強度で、通常はスキャンの感度を較正する。アレイの特定の位置に相補的なDNA配列が含まれ、その位置のシグナル強度が、ハイブリダイズする種の1:100,000の重量割合と相関性を有するようにできる。異なるフルオロフォアで標識した起源が別の2つのサンプル(試験用細胞と調節細胞)を、別々に発現する遺伝子を同定する目的で1つのアレイにハイブリダイズさせる場合、較正するcDNAのサンプルを2つのフルオロフォアで標識してハイブリダイゼーション混合液にそれぞれ同一量を加えて較正を行う。

【0255】

光電子増倍管の出力は、IBM互換性PCコンピュータにインストールした12ビットのRTI-835H アナログ - デジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いて、光電子増倍管の出力をデジタル化する。デジタル化さ

れたデータを、シグナルの強度がある線形20色画像変換 (linear 20-color transformation) によって青 (低シグナル) から赤 (高シグナル) の範囲の擬似色にマッピングし、画像として表示する。また、データを量的にも分析する。2つの異なるフルオロフォアを励起して同時に測定する場合、両フルオロフォア間の光学的漏話 (発光スペクトルの重複による) のために、各フルオロフォアの発光スペクトルを用いてデータを初めに補正する。

【0256】

それぞれの点からのシグナルがグリッドのそれぞれの中心になるように、蛍光シグナル画像にグリッドを重ね合わせる。次に、それぞれの要素内の蛍光シグナルを全体にまとめて、シグナルの平均強度に対応する数値を得る。GEMTOOLS 遺伝子発現解析プログラム (Incyte) を、シグナル解析用のソフトウェアとして用いる。

【0257】

9 相補的ポリヌクレオチド

SNEXN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な配列は、自然発生のSNEXNの発現の低下即ち阻害するために用いられる。約15~約30個の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、より小さな或いはより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。Oligo4.0ソフトウェア (National Biosciences) 及びSNEXNをコードする配列を用いて、好適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

配列から相補的なオリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコード配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがSNEXNをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0258】

1.0 SNEXNの発現

SNEXNの発現及び精製は、細菌またはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でSNEXN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ー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ーには、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)など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-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとSNEYNを発現する。真核細胞でのSNEYNの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多面性ウイルス(AcMNPV)を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、相同的組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって、SNEYNをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモーターによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、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、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(例えば、Engelhard, E. K.他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.を参照)。

【0259】

殆どの発現系では、SNEYNが、例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、またはFLAGや6-Hisなどのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く1回で行うことができる。Schistosoma japonicumからの26キロダルトンの酵素であるGSTによって、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で固定されたグルタチオンで融合タンパク質の精製が可能となる。(Pharmacia, Piscataway, N J)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でSNEYNからタンパク質分解的に切断できる。アミノ酸8個のペプチドであるFLAGで、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak, Rochester, N Y)を用いた免疫親和性の精製が可能となる。6個のヒスチジン残基が連続して伸展した6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN Inc, Chatsworth, CA)で精製

が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel (1995, 前出, ch 10, 16.)。これらの方法で精製したSNEXNを直接用いて、本実施例14のアッセイを行うことができる。

【0260】

1.1 機能的アッセイ

SNEXNの機能は、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SNEXN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ーを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。このようなベクターには、pCMV SPORT (Life Technologies)及びPCR 3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを含んでいる。5 ~ 10 μ gの組換えベクターを、好ましくは内皮由来か造血由来のヒト細胞株にリポソーム製剤或いは電気穿孔法によって一過性に形質移入する。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、形質移入された細胞と形質移入されていない細胞とを区別できる。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。このような標識タンパク質には、緑色蛍光タンパク質(GFP) (Clontech, Palo Alto, CA)、及びCD64またはCD64-GFP融合タンパク質が含まれる。レーザー光学に基づいた技術を利用した自動流動細胞計測法(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、アポトーシスの状態などの特性を評価する。また、FCMで、先行した或いは同時の細胞死の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。これらの現象には、プロピジウムヨウ化物でのDNAの染色によって計測される核DNA内容物の変化と、ブロモデオキシウリジンの取り込み量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節と、特異的な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のタンパク質の発現の変化と、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含まれる。流動細胞計測法は、Ormerod, M. G.による(1994) Flow Cytometry (Oxford, New York, NY.)に記載されている。

【0261】

遺伝子発現におけるSNEYNの影響は、SNEYNをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのどちら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)の保存された領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる。(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で公知の方法で細胞から精製することができる。SNEYN及び目的の他の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0262】

1.2 SNEYNに特異的な抗体の産生

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE) (例えば、Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 182:488-495を参照)または他の精製技術を用いて実質的に精製されたSNEYNを、標準的なプロトコルによりウサギを免疫化し、抗体を作り出すために用いる。

【0263】

別法では、SNEYNアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNASTAR Inc.)を用いて解析して免疫原性の高い領域を決定し、対応するオリゴペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を産生させる。C末端付近の、或いは隣接する親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択については、当分野で周知である(例えば、前出のAusubel他による11章を参照)。

【0264】

通常、約15残基の長さのオリゴペプチドを、FMOCケミストリを用いるABI 431A ペプチド合成機(PE Biosystems)で合成し、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)を用いた反応によりKLH(Sigma, St. Louis, MO)に結合させて、免疫原性を高める(例えば、前出のAusubel他による文献を参照)。フロイントの完全アジュバントにおいてオリゴペプチド-KLH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SNEYN活性を検査するには、例えば、ペプチドまたはSNEYNを基板に結合し

、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標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0265】

1.3 特異的抗体を用いる自然発生SNEXNの精製

自然発生SNEXN或いは組換えSNEXNを、SNEXNに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィ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、CNBr-活性化SEPHAROSE (Pharmacia & Upjohn) のような活性化クロマトグラフィー用レジンとSNEXN抗体とを共有結合させることにより構築する。結合の後、そのレジンを製造者の使用説明書に従って、ブロックし洗浄する。

【0266】

SNEXNを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、そのカラムをSNEXNを優先的に吸着できる条件下で(例えば、界面活性剤の存在下において高イオン強度のバッファーで)洗浄する。このカラムを、抗体とSNEXNとの結合を切るような条件下で(例えば、pH 2 - 3のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸塩イオンのようなカオトロピックイオンで)溶出させ、SNEXNを回収する。

【0267】

1.4 SNEXNと相互作用する分子の同定

SNEXN又は生物学的に活性なその断片を、¹²⁵I ボルトンハンター試薬(例えば、Bolton他(1973) Biochem. J. 133:529を参照)で標識する。マルチウェルプレートに予め配列しておいた候補の分子を、標識したSNEXNと共にインキュベートし、洗浄して、標識したSNEXN複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なSNEXN濃度で得られたデータを用いて、候補の分子とSNEXNとの結合、親和性、数について数値を計算する。

【0268】

別法では、Fields, S.及びO. Song (1989, Nature 340:245-246)に記載の酵母2ハイブリッドシステム、またはMATCHMAKERシステム(Clontech)などの2ハイブリッドシステムに基づいた市販のキットを用いて、SNEXNと相互作用する分子を解析する。

【0269】

SNEXNを用いて、高スループット式の酵母2ハイブリッドシステムを用いるPAT HCALLINGプロセス(CuraGen Corp., New Haven CT)で、遺伝子の2つの大きなライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定することができる(Nandabalan, K. 他(2000) U.S. Patent No. 6,057,101)。

【0270】

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うことができるであろう。特定の好適実施例に基づいて本発明を説明したが、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、分子生物学或いは関連する分野の専門家には明らかな本明細書に記載の本発明の実施のための方法の様々な改変は、特許請求の範囲に含まれることが意図されている。

【0271】

表の簡単な説明

表1は、SNEXNをコードする完全長の配列を構築するために用いた、ポリペプチド配列番号(SEQ ID NO:)及び核酸配列番号(SEQ ID NO:)、クローンID番号、cDNAライブラリ、断片を示す。

【0272】

表2は、潜在モチーフ及び相同配列を含む各ポリペプチド配列の特徴、並びにSNEXNの分析に用いた方法及びアルゴリズム、検索データベースを示す。

【0273】

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及び異常、病状と、各cDNAがクローニングされたベクターとを示す。

【0274】

表4は、SNEXNをコードするcDNAクローンが単離されたcDNAライブラリを作製するために用いた組織を示す。

【0275】

表5は、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドを分析するために用いた

ツール及びプログラム、アルゴリズムと、それらの適当な説明及び引用文献、閾値パラメータを示す。

【表1】

表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	3	2124842	BRSTNOT07	817762T1 (OVARTUT01), 824400T1 (PROSNOT06), 2072065F6 (ISLTNOT01), 2124842H1 (BRSTNOT07), 2821317H1 (ADRETUT06), 3120257F6 (LUNGTUT13), 3703757F6 (PENCNOT07)
2	4	5215690	BRSTNOT35	508422R6 (TMLR3DT02), 568428R6 (MMLR3DT01), 568428T6 (MMLR3DT01), 1318278F1 (BLADNOT04), 1318278T1 (BLADNOT04), 1454211F1 (PENITUT01), 1741685R6 (HIPONON01), 2791135F6 (COLNTUT16), 2823783F6 (ADRETUT06), 5215690H1 (BRSTNOT35), SANA00022F1

【表2】

表2

タンパク質 SEQ ID NO.	アミノ酸 残基数	潜在リン酸化部位	潜在グリコシル化 部位	サイン配列 (signature sequence) モチーフ、ドメイン	相同配列	分析方法
1	465	T36 S67 S174 S259 S383 T394 T414 T13 T77 S99 S160 S253 T291 S418 Y182 Y416		PhoX相同ドメイン: I86-N205	ソーティングネキシン14 [ヒト]g4689266	BLAST-GenBank HMMER-Pfam MOTIFS
2	450	S108 T221 S43 S61 S63 S108 T190 S266 S288 S289 T69 T210 S337 T349 S354 T359 Y226 Y249 Y326	N192 N208	シグナルペプチド: M1-G37 PhoX相同ドメイン: K56-E184	ソーティングネキシン7 [ヒト]g4689254	BLAST-GenBank SPScan HMMER-Pfam MOTIFS

【表3】

表3

ポリヌク レオチド SEQ ID NO	有用な核酸配列の 断片	発現組織 (割合)	疾患名または症状 (割合)	ベクター
3	974-1018	生殖(0.191) 神経(0.162)、 胃腸(0.147)	細胞増殖(0.574) 炎症(0.338)	P I N C Y
4	165-209	生殖(0.200) 神経(0.169) 胃腸(0.154)	癌(0.569) 炎症(0.169)、 細胞増殖(0.154)	P I N C Y

【表4】

表4

ポリヌクレオチド 配列ID番号	ライブラリ	ライブラリの説明
3	BRSTN0107	ライブラリは、43歳の白人女性の片側乳房切除の際に採取した病変乳房組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、上皮過形成及び乳頭腫症、管拡張を伴った軽度の増殖性線維囊胞性変化であった。また、関連腫瘍組織は、病理学的には広範な面皰壊死を伴った、浸潤性グレード4、核グレード3の乳房腺癌であった。患者の病歴には、癲癇、心血管疾患、II型糖尿病が含まれていた。
4	BRSTN0135	ライブラリは、46歳白人女性の片側乳房縮小術中に採取した胸部組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、両側の乳房実質であった。患者は、乳房肥大及び頭痛の症状があった。患者の病歴には、肥満症、腰痛、緑内障、アルコーロ中毒があった。家族歴には、白内障、変形性関節症、子宮癌、良性高血圧、高脂血症、アルコーロ性肝硬変、脳血管障害、II型糖尿病が含まれていた。

【表5】

表5-1

【表6】

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 あいまい塩基をマスキングするプログラム。	PE Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finderは、アミノ酸または核酸 配列の比較及び注釈に有用である。	PE Biosystems, Foster City, CA.; Paracel Inc., Pasadena, CA.	ミスマッチ<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラム。	PE Biosystems, Foster City, 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 有用であり、blastp 及び blastn、blastx、 tblastn、tblastx の5つの機能がある。	Altschul, S.F.他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (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、同合 わせの配列と一群の同種の配列との類似性 を検索する。FASTA は、fasta 及び tfasta、 fastx、tfastx、ssearch の少なくとも5つ の機能からなる。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; Pearson, W.R.(1990) Methods Enzymol. 183: 63-98; Smith, T.F. and 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、1つの配列 を BLOCKS 及び PRINTS、DOMO、PRODOM、PFAM データベースにおける配列に対して一致さ 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ティング領域を検索す る。	Henikoff, S. and J.G. Henikoff(1991), Nucleic Acids Res., 19:6565-6572.; Henikoff and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37: 417-424.	スコア=1000 以上 スコア/強度の比率=0.75 以上 該当する場合、確率値 =1.0E-3 以下
HMMER	PFAM などのタンパク質ファミリーのコンセン サス配列の Hidden Markov Model に基づ いたデータベースに対して、問い合わせ配 列を検索するアルゴリズムである。	Krogh, A.他(1994) J. Mol. Biol., 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L.ら (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322.	PFAM ヒットのスコア=10-50 ピ ット 個別のタンパク質ファミリー による

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.他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M.他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	標準化された質スコアの Prosite motif の GCG 特定「高い」値 通常、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度及び確率で自動配列機のトレースを検査する塩基読み出しアルゴリズムである。	Ewing, B.他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的な実施に基づいた SWAT や CrossMatch を含む Phils Revised Assembly プログラムは、配列相同性の検索及び 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; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120 以上 一致長さ=56 以上
Consed	Phrap assemblies の観察及び編集をするためのグラフィックツールである。	Gordon, D.他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキヤンして分泌シグナルペプチドの存在を調べる重みづけマトリクス分析プログラムである。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10: 1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12: 431-439.	スコア=5 以上
Motifs	Prosite で定義された配列と一致したパターンを得るためにアミノ酸配列を検索するプログラムである。	Bairoch 他、(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 YUE, Henry
 TANG, Y. Tom
 AZIMZAI, Yalda

<120> SORTING NEXINS

<130> PF-0706 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/136,740
 <151> 1999-05-27

<150> 60/139,566
 <151> 1999-06-16

<160> 4
 <170> PERL Program

<210> 1
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2124842CD1

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

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

<210> 2

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 5215690CD1

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 1992

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2124842CB1

<400> 3

gtatgaaaac tccaaaagt atgtagcta taccttagt ttatcatttt caaaactggt 60
 tttctttttt ttaataatg ttttcaata aactagactg ttgtgataat ttgctatgta 120
 cttgatacat tttgttttaa tattcaggaa cacacagaaa aggggagaat catttggat 180
 cagcagaata ggtagcaaaa ttaaaggagt attcaaaagt accacaatgg agggagctat 240
 gttgcctaata tatggtgtag ctgaagggtga agatgatttt attgaagaag gtattgttgt 300
 aatggaagat gattctccag tggagggtgt gagcacacct aatactcccc gaaaccttgc 360

```

tgcatggaaa attagcattc catatgtaga cttttttgag gatccctcct ctgaaaggaa 420
ggagaaaaaa gaaagaattc ctgtgttttg tattgatggt gaaagaaatg atagaagagc 480
agttggacac gagcctgaac attggtctgt ctatagaaga tatcttgaat tctatgtact 540
tgaatcaaaa ctaacagaat ttcattgtgc atttctgat gccagccttc cttctaagag 600
gatcattggc cccaaaaatt atgaattctt aaagtc aaagtc agggagagat tccaagaata 660
tctacagaaa cttctgcagc atccagaact gagtaatagt caacttctgg cagactttct 720
ttccccta at ggtggggaaa cacaatttct tgataagata ctaccagatg taaatcttgg 780
gaaaattata aaatctgttc ctggaaaact aatgaaagag aaaggtcagc atttggaacc 840
ttttatcatg aatctcatta atttctgtga gtctccaaag cctaaacca gtagaccaga 900
actgaccatt ctcagcccta cttcagaaaa caacaagaag cttttcaatg atctgtttaa 960
aaataatgca aaccgtgctg aaaatacaga gagaaagcaa aatcagaatt attttatgga 1020
ggtgatgact gtagaaggag tctatgatta cctgatgtat gtaggacggg tagttttcca 1080
ggttcctgac tggcttcate atctctta at ggaactcga atcctcttta aaaacacct 1140
ggaaatgtat actgattact atcttcagtg taactagaa cagctatttc aggagaccg 1200
tttggctca ctcataacac ttctcagaga tgctatattc tgtgaaaaca ctgaacctcg 1260
ctctcctcaa gtaaacgaaa aaggagcaaa acagactttt gaagaaatga tgaattacat 1320
tccagatctg ttagtcaagt gtattgtgga agaaaccaag tatgaaagca tcagacttct 1380
gtttgatggc ttacagcaac cagtaactca caagcagctg acttatgttt tattggacat 1440
tgtgatacag gaactgttcc cagagctcaa taaggtaca aaggaagtta cctctgtgac 1500
atcttggtat tgcaactttg gatttgggat agaataacc attgaaatct ctgctgtgag 1560
aggggtgtag aaatttactt ttttgggtat attcttata atattatgta catcgtgtc 1620
tgaattttta gttatttttt gtttttaata aagactaaca caaactta at gattaaaagt 1680
gattgagtct catagtcttt catttgctag ctgtgatcca aattttatta gaacataagt 1740
cacttggtat tgcaactttt aaaagagaaa atcataatg atgttatggc aaacagataa 1800
gactgataaa cttcgtattg tatagctttg aaaataatta tgcctagtat ggagaaacag 1860
gaataagatc tgattttctt agagttaata tatttttagta gattgggttt cctttttttt 1920
atthttgata tagttaactg tgtatctata aataaagcat cctatatgag tttttaataa 1980
taaaaaaaa aa

```

<210> 4

<211> 2507

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 5215690CB1

<400> 4

```

cgcgccgaac tgcagccatg gagcaggcac ctccggacc cagcggcag ctccagccgg 60
cgcccttggg gccgctgggc tccccagac ctgggctggg ggctgctgct ggcaaggaag 120
gggagggggc cggagaagag agctctgggg tcgacacgat gacacacaat aatttttgg 180
tgaagaagat agaaatcagt gtttcagaag cagaaaaacg aactggaaga aatgccatga 240
acatgcaaga aacatatact gcttacctca ttgaaacaag gtcagttgaa cataccgatg 300
gtcagagtggt cctaacagac tcaactatgg gccgatatag tgaatttgag ttgttgagaa 360
gctacctttt agtttactat ccacatattg ttgtgccacc tctgccagaa aaacgggcag 420
aatthgtttg gcataaactc tctgctgaca acatggatcc agattttgtg gagagcgac 480
ggattgggtt agaaaaactt ctcttgagga ttgcttcaca tccatcctt tgtagagaca 540
aaatcttcta tctgttttta acacaggaag gtaactggaa ggagactgtg aatgaaactg 600
ggtttcagct gaaggcagac tccaggttaa aagcgttaa tgcaacattc agagtgaaaa 660
accagacaaa gagatttact gaccttaagc actatagtga tgaactgcag tctgtcatct 720
cacatcttct tcgagtcaga gctagagtag cagatcgact ctatgggtga tataaagtac 780
atgggaatta tggctgagtt ttcagtgaat ggagtgccat agaaaaagaa atgggtgatg 840
gactgcagag tgctggctcat catatggatg tgtatgcatc ttctattgat gatattttg 900
aagatgaaga acattatgca gatcagttaa aagagtatct tttttatgca gaagcattgc 960
ggctgtgtg caggaacat gaacttatgc agtatgactt ggagatggct gctcaggact 1020
tagcatccaa gaagcagcag tgtgaggaac tggtaactgg gactgtgaga acattctctt 1080
tgaagggat gactaccaag ctctttggtc aagaaactcc agagcagaga gaagccagaa 1140
taaaggtgct agaagaacaa ataaatgaag gagaacaaca gctaaaagtct aaaaatctgg 1200
aaggcagaga atthttgaaa aacgcattgg ctgatattga acgcttcaaa gaacaaaaga 1260
accgagactt aaaggaggcc ctcataagct atgcagctcat gcagatcag atgtgcaaaa 1320

```

```

agggaaattca agtttggacc aatgctaag agtgcttag caagatgtaa tcctgtgaat 1380
tgaatttctc ttcaatcaaa gtgccccaaa acagaagcac aagtaaataa aagaaattta 1440
agtcactacc tagtatacat aaacatatac aataagttaa ataaattcag ctttctttaa 1500
cttaattgtg gtcgtgttaa tgtagcacia aaaatatatt ttaatgaaga ttaaataata 1560
taatttgagg ttttggggac tggtgctgat tccaaaaagt taatttaata atataacca 1620
acagattggt tgtcacgctt ctgaaccaat gactgaatgt caagatgttc gtaatttctt 1680
agatgtttgt ttcaagacca gctgtttcag atctattaat gtagggaatt tttccctaag 1740
attgaattcc tatatttact tggtaagatc cactaatctg ttataggag ttgttttctc 1800
ttgccttata gttgagctat ttgttttgac aaagctcagc agaaacttga tgtgaaaaat 1860
ctacgatttt cttctacatt cattgatgcc ccttgtaatg ttgcataca ctagaaaatg 1920
ccttcaattt gtgttttacc agaattttga tactggtcag aaattttata ctgccaacia 1980
agaagactca acttctcaga tctataatgg gatacattgt catcctctag caactcctat 2040
atagaaagtt ttaactgaat atgttacata taagaattaa attccttca aataattctt 2100
aacctcagta atgagcctaa atttactctg cttggctctc tacacatggc atttcagggt 2160
ataagatgta gcatttcaat gtgtaagata tatgtactaa acatatgtgt tgctatcttc 2220
atcattaaca tccttctttt ctattgcttg gctgtaattt ttgtaaagat aaattatatt 2280
gtttttttgt atgtgtgttt gtagtatatg ttcagaaggc aagcatctc attttgctag 2340
ctttgcagaa tcttaaaatg tgtactcgtt atttctaag atgtaaaaaa aaatccctag 2400
tcctgttag catttgactt ttttatatgt tttaaatgtt gctggatttt tgtgctgttt 2460
gccaaactta tacaataaat aaatgaaata ttgtgctgaa aaaaaaa 2507

```

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/14831
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/17		
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	EMBL database, Heidelberg, FRG Emhum2 accession number AF121863 27 April 1999 TEASDALE, R.D. ET AL.: "Homo sapiens sorting nexin 14 (SNX14) mRNA, partial cds" XP002149759 the whole document --- -/--	1,3,6,7, 9,11-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document 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. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 October 2000		Date of mailing of the international search report 10. 1. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fuchs, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US 00/14831

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 99 38972 A (CHIRON CORP., HYSEQ INC.) 5 August 1999 (1999-08-05)	1,3, 6-16,18, 19,22, 25-27
A	abstract page 1, line 1 -page 17, line 18 page 29, line 4 -page 32, line 10 page 36, line 12 -page 49, line 24 page 68, line 3 -page 76, line 14 page 241; table 1 page 544; table 2 page 653 -page 655; claims 1,9,11-14 SEQ ID NO: 4852 page 2306 -page 2307 ---	2,4,5,17
P,X	EMBL database, Heidelberg, FRG Emhum2 accession number AK000362 22 February 2000 SUGANO, S. ET AL.: "Homo sapiens cDNA FL20355 fis, clone HEP15804, highly similar to AF121863 Homo sapiens sorting nexin 14" XP002149760 the whole document ---	1,3,6,7, 9,11-15
A	US 5 804 412 A (GILL, G.N. ET AL.) 8 September 1998 (1998-09-08) abstract column 3, line 47 -column 24, line 13 column 43 -column 44; claims 1-17 -----	1-19,22, 25-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/14831**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 18 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.: 20, 21, 23 and 24
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.:
1-10, 16-19, 22, 25-27 completely and 11-15 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

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 20, 21, 23 and 24

Claims 20, 21, 23 and 24 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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-10, 16-19, 22,
25-27 completely and 11-15 partially

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: 3, b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 3, c) a polynucleotide sequence complementary to a); 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 or by PCR; a pharmaceutical composition comprising an effective amount of said polypeptide; a method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional SNEYN, 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 for a compound that specifically binds to said polypeptide or that modulates the activity of said polypeptide; a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a polynucleotide sequence having the SEQ ID NO: 3;

2. Claims: 28-33 completely and 11-15 partially

An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of: a) a polynucleotide sequence having the SEQ ID NO: 3, b) a naturally occurring polynucleotide sequence having at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 4, 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 or by PCR; a recombinant polynucleotide comprising the polynucleotide sequence SEQ ID NO: 4; a cell transformed

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

with said recombinant polynucleotide; a transgenic organism comprising said recombinant polynucleotide; a method for producing said polypeptide; a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a polynucleotide sequence having the SEQ ID NO: 4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/14831

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9938972 A	05-08-1999	AU 2471699 A	16-08-1999
		EP 1053319 A	22-11-2000
		AU 2095599 A	19-07-1999
		AU 4187499 A	29-11-1999
		WO 9933982 A	08-07-1999
		WO 9958675 A	18-11-1999
		AU 6263999 A	17-04-2000
		WO 0018916 A	06-04-2000

US 5804412 A	08-09-1998	NONE	

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 21/00		A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
25/00		37/02	4 H 0 4 5
35/00		43/00	1 0 5
37/02		C 0 7 K 14/47	
43/00	1 0 5	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		33/566	
33/50		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/53		5/00	A
33/566		A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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 アジムザイ、ヤルダ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州94545・
 ハイワード・ロックスプリングスドライブ
 2045

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36
FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 AA12 BA80 CA04
CA09 CA12 HA14 HA17
4B063 QA08 QA13 QA18 QA19 QQ08
QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36
QR48 QR55 QR62 QR77 QS25
QS34
4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA14
4B065 AA93Y AB01 CA24 CA44
CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01
BA22 CA53 DC50 ZA012
ZA662 ZA812 ZA942 ZB212
ZB262
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	排序nexxin		
公开(公告)号	JP2003503016A	公开(公告)日	2003-01-28
申请号	JP2001500658	申请日	2000-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	ユエヘンリー タングワイトム アジムザイヤルダ		
发明人	ユエ、ヘンリー タング、ワイトム アジムザイ、ヤルダ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P15/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/00 A61P15/00 A61P21/00 A61P25/00 C07K14/4703 C12Q1/6883 C12Q2600/158 Y02A50/471		
FI分类号	A61K45/00 A61P1/00 A61P15/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.105 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 G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA08 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/ZA012 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZA942 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	60/136740 1999-05-27 US 60/139566 1999-06-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了人分选神经毒素 (SNEYN) 和鉴定和编码它的多核苷酸。 本发明还提供表达载体和宿主细胞，抗体，激动剂，拮抗剂。 此外，本发明提供了一种用于诊断或治疗与SNEYN表达有关的疾病的方法及其预防方法。

