

(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 - 517838

(P2003 - 517838A)

(43)公表日 平成15年6月3日(2003.6.3)

(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 3/06	4 B 0 2 4
45/00		9/00	4 B 0 5 0
A 6 1 P 3/06		35/00	4 B 0 6 3
9/00		37/02	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全176数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 546895(P2001 - 546895)

(86)(22)出願日 平成12年12月20日(2000.12.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月17日(2002.6.17)

(86)国際出願番号 PCT/US00/35304

(87)国際公開番号 W001/046397

(87)国際公開日 平成13年6月28日(2001.6.28)

(31)優先権主張番号 60/172,066

(32)優先日 平成11年12月23日(1999.12.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/176,107

(32)優先日 平成12年1月14日(2000.1.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミックス・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 ヤング、ジュンミング

アメリカ合衆国カリフォルニア州95129・サンノゼ・パークレーン 7125

(72)発明者 ボーゲン、マライア・アール

アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・サンレアンドロ・サンティアゴロード 1424

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトキナーゼ

(57)【要約】

本発明は、ヒトキナーゼ (PKIN) と、PKINを同定及びコードするポリヌクレオチドとを提供する。本発明はまた、発現ベクター及び宿主細胞、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、PKINの発現に関連する疾患の診断・治療・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乃至SEQ ID NO:12 (SEQ ID NO:1 - 12) からなる群から選択されたアミノ酸配列と、

(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、

(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、

(d) SEQ ID NO:1 - 12からなる群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする単離されたポリペプチド。

【請求項2】 SEQ ID NO:1 - 12からなる群から選択された請求項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単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】 SEQ ID NO:13 - 24からなる群から選択された請求項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された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のポリペプチドを生産する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、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された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ステップと、

(b) そのように発現したポリペプチドを回収するステップとを含むことを特徴とする請求項1のポリペプチドの生産方法。

【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:13-24からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と、

(b) SEQ ID NO:13-24からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然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)乃至(d)のRNA等価物とで構成される群から選択された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】 サンプルにおいて、請求項11に記載のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) 前記サンプルをプローブでハイブリダイズするステップであって、前記プローブが、前記サンプル内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み、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の間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、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、該ステップと、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。

【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】 サンプルにおいて、請求項11のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて、前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するステップと、

(b) 増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含むことを特徴とする標的ポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項16】 有効量の請求項1のポリペプチド及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項17】 前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-12からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16の組成物。

【請求項18】 機能的なPKIN(新規のキナーゼ)の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項16の組成物を投与すること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曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出するステップ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及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項21】 機能的なPKINの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項20の組成物を投与すること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曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出するステップ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トゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

【請求項24】 機能的なPKINの過剰な発現に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項23の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項25】 請求項1のポリペプチドに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) 請求項1のポリペプチドを好適な条件下で少なくとも1つの試験化合物と結合させるステップと、

(b) 請求項1のポリペプチドと前記試験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ステップ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化させ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のポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも1つの試験化合物と結合させるステップと、

(b) 前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性を評価するステップと、

(c) 前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性と、前記試験化合物の不在下での請求項1のポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、

前記試験化合物の存在下での請求項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化させる化合物の存在を示唆すること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化させるのに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の発現に好適な条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップと、

(c) 様々な量の前記化合物の存在下での前記標的ポリヌクレオチドの発現と、前記化合物の不在下での前記標的ポリヌクレオチドの発現とを比較するステップを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項28】 試験化合物の毒性を評価する方法であって、

(a) 核酸を含む生体サンプルを前記試験化合物で処理するステップと、

(b) 処理した前記生体サンプルの核酸と、請求項11のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続するヌクレオチドを含むプローブをハイブリダイズさせるステップであって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項11のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を含むポリヌクレオチドである、前記ステップと、

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、

(d) 前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量を、未処理の生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量と比較するステップとを含み、

前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差が試験化合物の毒性を示唆することを特徴とする試験化合物の毒性評価方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、キナーゼの核酸配列及びアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した癌、免疫疾患、成長および発達に影響を及ぼす疾患、心血管疾患、および脂質異常の診断・治療・予防に関する。本発明はさらに、キナーゼの核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価に関する。

【0002】**(発明の背景)**

キナーゼは最も大きな既知の酵素スーパーファミリー構成し、標的分子が多様である。キナーゼは、高エネルギーリン酸基のリン酸供与体からリン酸受容体への移動を触媒する。ヌクレオチドは通常、これらの反応においてリン酸供与体として働き、ほとんどのキナーゼはアデノシン三リン酸(ATP)を利用する。リン酸受容体には様々な分子が可能であり、その中には、ヌクレオシド、ヌクレオチド、脂質、炭水化物、およびタンパク質が含まれる。タンパク質は、ヒドロキシアミノ酸においてリン酸化される。リン酸基が付加されると、受容体分子における局所電位が変化し、それによって内部構造が変化し、細胞内接触を引き起こし得る。可逆的なタンパク質のリン酸化は、真核細胞におけるタンパク質活性の調節の主な方法である。一般に、タンパク質は、ホルモン、神経伝達物質、成長因子、および分化因子などの細胞外シグナルに応答したリン酸化により活性化される。活性化されたタンパク質は細胞の細胞応答を、細胞内シグナル伝達経路、並びにタンパク質リン酸化を調節するサイクリックヌクレオチド、カルシウム-カルモジュリン、イノシトール、および様々な分裂促進因子などのセカンドメッセンジャー分子によって開始させる。

【0003】

キナーゼは、解糖などの基本的な代謝プロセスから細胞周期の調節、分化、およびシグナル伝達カスケードによる細胞外環境との情報交換に至る細胞機能の全てに関与する。細胞内における不適切なタンパク質のリン酸化は、細胞周期の進

行および細胞増殖における変化に関連する。細胞周期における変化は、アポトーシスや癌の誘導に関連する。細胞分化における変化は、生殖系、免疫系、および骨格筋の疾患や障害に関連する。

【0004】

プロテインキナーゼには2つのクラスがある。一方のクラスのプロテインチロシンキナーゼ (PTK) はチロシン残基をリン酸化し、他方のクラスであるプロテインセリン/トレオニンキナーゼ (STK) はセリン残基およびトレオニン残基をリン酸化する。ある種のPTKおよびSTKは、両方のファミリーの構造的な特徴を有し、チロシン残基およびセリン/トレオニン残基の両方に対して特異性 (二重特異性) を有する。ほとんど全てのキナーゼは、キナーゼファミリー特有の特定の残基および配列モチーフを含む保存された250~300のアミノ酸からなる触媒ドメインを含む。プロテインキナーゼ触媒ドメインは、更に11のサブドメインに分類することができる。N末端サブドメインI-IVは、ATP供与体分子に結合して方向性を与える2葉構造 (two lobed structure) に折り畳まれ、サブドメインVは2葉にまたがる。C末端サブドメインVI-XIはタンパク質基質と結合し、リン酸をATPからチロシン残基、セリン残基、またはトレオニン残基のヒドロキシル基に移動させる。11のサブドメインのそれぞれは、サブドメインに特徴的なアミノ酸モチーフ或いは特定の触媒残基を含む。例えば、サブドメインIは、8個のアミノ酸からなる高グリシンATP結合共通モチーフを含み、サブドメインIIは、触媒活性の最大化に必要な重要なリシン残基を含み、サブドメインVIからIXは高度に保存された触媒中心を含む。PTKおよびSTKはまた、ヒドロキシアミノ酸特異性を付与し得るサブドメインVIおよびVIIIに固有の配列モチーフを含む。

【0005】

更に、キナーゼは、キナーゼドメイン内に含まれるか或いは隣接する通常は5~100の範囲の残基からなる追加のアミノ酸配列によって分類され得る。これらの追加のアミノ酸配列は、キナーゼ活性を調節し基質特異性を決定する (Hardie, G. および Hanks, S. (1995) *The Protein Kinase Facts Book*, Vol 1 p.p. 17-20 Academic Press, San Diego, CA.を参照)。具体的には、2つのプロテインキナーゼシグネチャ配列が、キナーゼドメインで同定された。第1のプロテ

インキナーゼシグネチャ配列は、ATP結合に関与するリシン残基活性部位を含み、第2のプロテインキナーゼシグネチャ配列は触媒活性に重要なアスパラギン酸残基を含む。分析するタンパク質がこの2つのプロテインキナーゼシグネチャを含む場合、そのタンパク質がプロテインキナーゼである確率は100%に近い(PROSITE: PDOC00100, November 1995)。

【0006】

プロテインチロシンキナーゼ

プロテインチロシンキナーゼ(PTK)は、膜貫通受容体PTKタンパク質または非膜貫通非受容体PTKタンパク質のいずれかに分類され得る。膜貫通チロシンキナーゼは、ほとんどの成長因子に対する受容体として機能する。成長因子が受容体チロシンキナーゼ(RTK)に結合し、それによって受容体が、自己(自己リン酸化)および特定の細胞内セカンドメッセンジャータンパク質をリン酸化する。受容体PTKに結合する成長因子(GF)は、上皮成長因子GF、血小板由来GF、繊維細胞芽GF、肝細胞GF、インスリンおよびインスリン様GF、神経GF、血管内皮GF、およびマクロファージコロニー刺激因子が含まれる。

【0007】

非膜貫通型非受容体PTKは、膜貫通領域を含まない代わりに細胞膜受容体の細胞質ドメインとシグナル伝達複合体を形成する。非受容体PTKを介して機能する受容体には、サイトカイン受容体およびホルモン受容体(成長ホルモンおよびプロラクチン)や、Tリンパ球およびBリンパ球における抗原特異的受容体が含まれる。

【0008】

多くのPTKは、PTK活性が正常な細胞制御を受けない癌細胞における腫瘍遺伝子産物として初めに同定された。実際に、約3分の1の腫瘍遺伝子がPTKをコードする。更に、細胞形質転換(発癌)はチロシンリン酸化活性の上昇を伴う場合が多い(Charbonneau, H. および Tonks, N. K. (1992) Annu. Rev. Cell Biol. 8:463-93)。従って、PTK活性の調節は、ある種の癌を制御するための重要な手段となり得る。

【0009】

プロテインセリン/トレオニンキナーゼ

プロテインセリン/トレオニンキナーゼ (STK) は非膜貫通型タンパク質である。STKのサブクラスは、ERK (細胞外シグナル調節キナーゼ) またはMAP (マイトジェン活性化プロテインキナーゼ) として知られ、様々なホルモンや成長因子による細胞刺激によって活性化される。細胞刺激には、MEK (MAP/ERKキナーゼ) のリン酸化に導くシグナル伝達カスケードを含む。MEKのリン酸化の後に、セリンおよびトレオニンのリン酸化によりERKが活性化される。多数のタンパク質が活性なERKに対する下流のエフェクターであることから、細胞増殖および分化の調節や、細胞骨格の調節に関与すると思われる。ERKの活性化は通常一過性であり、細胞は、そのダウンレギュレーションに関係する二重特異性ホスファターゼを有する。また様々な研究から、ERK活性の上昇がある種の癌に関連することが分かった。その他のSTKには、サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA)、カルシウム - カルモジュリン (CaM) 依存性プロテインキナーゼ、およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP) などのセカンドメッセンジャー依存性プロテインキナーゼや、サイクリン依存性プロテインキナーゼ、チェックポイントおよび細胞周期キナーゼ、増殖関連キナーゼ、5'-AMP-活性化プロテインキナーゼ、アポトーシスに関与するキナーゼが含まれる。

【0010】

セカンドメッセンジャー依存性プロテインキナーゼは、サイクリックAMP (cAMP)、サイクリックGMP、イノシトール三リン酸、ホスファチジルイノシトール、3,4,5-三リン酸、サイクリックADPリボース、アラキドン酸、ジアシルグリセロールおよびカルシウム - カルモジュリンなどのセカンドメッセンジャーの効果を主に仲介する。PKAはホルモン誘導性細胞応答の仲介に関与し、ホルモン刺激に反応して細胞内で生成されるcAMPによって活性化される。cAMPは、研究した全ての動物細胞におけるホルモン作用の細胞内メディエーターである。ホルモン誘導性細胞応答には、甲状腺ホルモン分泌、コルチゾール分泌、プロゲステロン分泌、グリコーゲン分解、骨再吸収、心拍数の調節、および心筋収縮力の調節が含まれる。PKAは全ての動物細胞に見られ、これらほとんどの細胞におけるcAMPの効果に関係すると思われる。PKA発現の変化は、癌、甲状腺疾患、糖尿病、アテロー

ム性動脈硬化症、および心血管疾患に関連する (Isselbacher, K. J.ら, (1994) Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, New York, NY, pp. 416-431, 1887)。

【0011】

カゼインキナーゼI (CKI) 遺伝子ファミリーは、セリン/トレオニンプロテインキナーゼの別のサブファミリーである。この持続的に拡大するキナーゼ群は、細胞代謝、DNAの複製、およびDNAの修復を含む様々な細胞プロセスおよび核プロセスの調節に関与する。CKI酵素は、真核細胞の膜、核、細胞質および細胞骨格や、哺乳動物細胞の紡錘体上に存在する (Fish, K. J.ら, (1995) *J. Biol. Chem.* 270:14875-14883.)。

【0012】

CKIファミリーメンバーの全ては、9~76のアミノ酸からなる短いアミノ末端ドメイン、284のアミノ酸からなる高度に保存されたキナーゼドメイン、および24~200を超える範囲のアミノ酸からなる可変カルボキシル末端ドメインを含む (Cegielska, A.ら, (1998) *J. Biol. Chem.* 273:1357-1364.)。このCKIファミリーは高度に関連するタンパク質からなる。これは、様々な試料からのカゼインキナーゼIのイソ型の同定によって確認されている。 、 、 、 、 および の少なくとも5つの哺乳動物イソ型が存在する。Fishらが、ヒト胎盤cDNAライブラリからCKI を同定した。このCKI は416のアミノ酸からなる塩基性タンパク質であり、CKIデルタに類似している。組み替え発現によって、CKI が既知のCKI基質をリン酸化し、CKI特異的インヒビターであるCKI-7によって抑制されることが分かった。CKI のヒト遺伝子は、酵母CKI遺伝子座であるHRR250の欠失によって起こる成長が遅い表現型 (slow-growth phenotype) を有する酵母を助けることができる。

【0013】

哺乳動物突然変異概日tauが、シリアンハムスターにおける概日リズムの周期を著しく短くするCKI の半優性染色体対立遺伝子であることが分かった。tau遺伝子座はカゼインキナーゼI によってコードされ、ショウジョウバエ概日遺伝子double-timeの相同体でもある。野生型およびtau突然変異CKI 酵素の両方の

研究から、突然変異酵素はその最大速度が著しく低下し、自己リン酸化状態であることが分かった。更に、in vitroにおけるCKI は哺乳動物PERIODタンパク質と相互作用する能力を有するが、突然変異酵素はPERIODをリン酸化する能力に欠ける。Lowreyらが、CKI が概日機構の中心をなす転写 - 翻訳系の自己調節ループ内の負のフィードバックシグナルを遅らせる重要な因子であると主張した。従って、CKI 酵素は、概日リズム、時差ぼけおよび睡眠、更に概日調節下のその他の生理的プロセスおよび代謝プロセスに影響を与える医薬組成物の理想的な候補である (Lowrey, P. L.ら, (2000) Science 288:483-491.)。

【0014】

カルシウム - カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ

カルシウム - カルモジュリン (CaM) 依存性キナーゼは、平滑筋の収縮、グリコーゲン分解 (ホスホリラーゼキナーゼ)、および神経伝達 (CaMキナーゼIおよびCaMキナーゼII) の調節に関与する。CaM依存性プロテインキナーゼは、細胞内の遊離カルシウムの濃度に応答して細胞内カルシウム受容体であるカルモジュリンによって活性化される。多くのCaMキナーゼはまた、リン酸化によって活性化される。ある種のCaMキナーゼはまた、自己リン酸化またはその他の調節キナーゼによって活性化される。CaMキナーゼIは、神経伝達物質関連タンパク質であるシナプシンIおよびII、遺伝子転写調節因子であるCREB、および嚢胞性繊維コンダクタンス調節タンパク質であるCFTRを含む様々な物質をリン酸化する (Haribabu, B.ら, (1995) EMBO Journal 14:3679-3686)。また、CaMキナーゼIIIは、様々な部位においてシナプシンをリン酸化し、チロシンヒドロキシラーゼのリン酸化および活性化によって脳におけるカテコールアミンの合成を調節する。CaMキナーゼIIはまた、チロシンヒドロキシラーゼおよびトリプトファンヒドロキシラーゼのリン酸化/活性化によってカテコールアミンおよびserotoninの合成を調節する (Fujisawa, H. (1990) BioEssays 12:27-29)。カルモジュリン結合プロテインキナーゼ様タンパク質をコードするmRNAが哺乳動物前頭葉で多量に見つかった。このタンパク質は軸索および樹状突起の双方における小胞に結合し、主に出生後に蓄積される。このタンパク質のアミノ酸配列はCaM依存性STKに類似しており、このタンパク質はカルシウムの存在下でカルモジュリンと結合する (Godb

out, M.ら, (1994) J. Neurosci. 14:1-13)。

【0015】

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ

マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAP) は、リン酸化カスケードによって細胞表面から核へのシグナル伝達を仲介する。MAPは、細胞内シグナル伝達経路を調節する別のSTKファミリーである。いくつかのサブグループが同定されており、それぞれが異なった基質特異性を有し、固有の細胞外刺激に応答する (Egan, S. E.およびWeinberg, R. A. (1993) Nature 365:781-783)。MAPキナーゼシグナル伝達経路は、哺乳動物細胞および酵母に存在する。MAPキナーゼ経路を活性化する細胞外刺激には、上皮成長因子 (EGF)、紫外線、高浸透圧媒体、熱ショック、内毒素性リポ多糖 (LPS)、腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターロイキン-1 (IL-1) などの前炎症性サイトカインが含まれる。MAPキナーゼ発現の変化は、癌、炎症、免疫疾患、および成長および発達に影響を及ぼす疾患を含む様々な疾患に関与する。

【0016】

サイクリン依存性プロテインキナーゼ

サイクリン依存性プロテインキナーゼ (CDK) は、細胞周期を介して細胞の進行を調節するSTKである。細胞は、サイクリンと呼ばれる活性化タンパク質ファミリーの合成および分解による調節により、有糸分裂に入ったり有糸分裂から出たりする。小さな調節タンパク質であるサイクリンはCDKに結合してそのCDKを活性化させる。それによって、有糸分裂プロセスに関与する選択されたタンパク質がリン酸化され活性化される。CDKは、活性化するために多数の入力が必要であるという点でユニークである。サイクリンの結合に加えて、CDKの活性化には、CDKにおける特定のトレオニン残基のリン酸化および特定のチロシン残基の脱リン酸化が必要である。

【0017】

NIMA (有糸分裂に決して入らない) 関連キナーゼ (Neks) は細胞周期に関連するSTKの別のファミリーである。CDKおよびNekの両方は、動物細胞における複製、成熟、微小管形成中心である中心体の分離に関与する (Fry, A. M.ら, (1998)

EMBO J. 17:470-481)。

【0018】

チェックポイントおよび細胞周期キナーゼ

細胞分化のプロセスでは、細胞周期移行の順番およびタイミングは細胞周期チェックポイントの制御下にある。この細胞周期チェックポイントは、DNA複製および染色体分離などの重要なプロセスが正確に実行されるようにする。例えば放射線などによってDNAが損傷を受けた場合、チェックポイント経路が活性化され、修復の時間を与えるべく細胞周期が停止される。損傷が大きい場合には、アポトーシスが誘導される。このようなチェックポイントが存在しないと、損傷したDNAが異常な細胞に受け継がれ、癌などの増殖異常が引き起こされ得る。プロテインキナーゼは、このプロセスにおいて重要な役割を果たす。例えば、特定のキナーゼすなわちチェックポイントキナーゼ1 (Chk1) が酵母および哺乳動物で同定された。このChk1は、酵母におけるDNA損傷によって活性化される。Chk1が活性化されると、G2/M移行において細胞が停止する。(Sanchez, Y.ら, (1997) Science 277:1497-1501.) 具体的には、Chk1が細胞分裂サイクルホスファターゼCdc25をリン酸化し、それによってサイクリン依存性キナーゼCdc2を脱リン酸化して活性化するCDC25の正常な機能が阻害される。Cdc2の活性化によって細胞が有糸分裂に入るのが調節される(Peng, C-Yら, (1997) Science 277:1501-1505.)。従って、Chk1の活性化によって、損傷した細胞が有糸分裂に入るのが阻止される。Chk1のようなチェックポイントキナーゼの同様の欠損によっても、G2/Mのような他のチェックポイントにおいてDNAが損傷した細胞が停止できないことにより癌が引き起こされ得る。

【0019】

細胞増殖関連キナーゼ

細胞増殖関連キナーゼは、ヒト巨核球細胞における細胞周期および細胞増殖の調節に關与する血清/サイトカイン誘導性STKである(Li, B.ら, (1996) J. Biol. Chem. 271:19402-8)。増殖関連キナーゼは、細胞分裂に關与するSTKのpolo (ショウジョウバエpolo遺伝子に由来する)ファミリーに關連する。増殖関連キナーゼは肺腫瘍組織においてダウンレギュレートされ、プロトオンコジーンであ

と思われる。プロトオンコジーンが正常な組織において制御を受けないで発現すると、正常な組織が癌化し得る。

【0020】

5'-AMP-活性化プロテインキナーゼ

リガンド活性化STKプロテインキナーゼは、5'-AMP-活性化プロテインキナーゼ (AMPK) である (Gao, G.ら, (1996) J. Biol Chem. 271:8675-8681)。哺乳動物AMPKは、酵素であるアセチル-CoAカルボキシラーゼおよびヒドロキシメチルグルタリル-CoAレダクターゼのリン酸化による脂肪酸およびステロールの合成の調節因子であって、熱ショックやグルコースおよびATPの枯渇などの細胞内ストレスに対するこれらの経路の応答を仲介する。AMPKは、触媒サブユニットと、このサブユニットの活性を調節すると考えられている2つの非触媒サブユニットおよびサブユニットからなるヘテロ三量体複合体である。AMPKのサブユニットは、脳、心臓、脾臓、および肺などの非脂肪性組織において予想以上に広く分布している。この分布から脂質の代謝の調節以外にもある役割を果たしていると考えられる。

【0021】

アポトーシスにおけるキナーゼ

アポトーシスは、細胞死を導く高度に制御されたシグナル伝達経路であって、組織の発達および恒常性に極めて重要な役割を果たしている。このプロセスの調節不全は、自己免疫疾患、神経変性疾患、および癌を含む様々な疾患の病原に関連する。様々なSTKがこのプロセスにおいて重要な役割を果たす。ZIPキナーゼは、N末端プロテインキナーゼドメインに加えてC末端ロイシンジッパードメインを含むSTKである。このC末端ドメインは、ホモ二量体化およびキナーゼの活性化、ならびに転写因子のサイクリックAMP応答性エレメント結合タンパク質 (ATF/CREB) ファミリーのメンバーである活性化転写因子ATF4などの転写因子との相互作用を仲介する (Sanjo, H.ら, (1998) J. Biol. Chem, 273:29066-29071)。DRK1およびDRK2は、死関連プロテインキナーゼ (DAPキナーゼ) と同源性を共有するSTKであって、インターフェロン誘導性アポトーシスにおいて機能することが知られている (Sanjoら 前出)。ZIPキナーゼと同様に、DAPキナーゼも、N末

端キナーゼドメインに加えてアンキリンリピート型のC末端タンパク質 - タンパク質相互作用ドメインを含む。ZIP、DAP、およびDRAKキナーゼは、NIH3T3細胞に形質転換されるとアポトーシスに関連する形態変化を誘導する (Sanjoら, 前出)。しかしながら、これらのタンパク質のN末端キナーゼ触媒ドメインか或いはC末端ドメインのいずれかが欠失すると、アポトーシス活性がなくなる。このことから、キナーゼ活性に加えてC末端ドメインにおける活性も、アポトーシスに必要であり、調節因子または特定の基質と相互作用するドメインの可能性はある。

【0022】

RICKは、死受容体CD95を含む特定のアポトーシス経路を仲介するとして近年同定された別のSTKである (Inohara, N.ら, (1998) J. Biol. Chem. 273:12296-12300)。CD95は腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーであって、免疫系の調節および恒常性において重要な役割を果たす (Nagata, S. (1997) Cell 88:355-365)。CD95受容体シグナル伝達経路は、様々な細胞内分子の受容体複合体への動員、およびそれに続くリガンド結合を伴う。このプロセスは、システインプロテアーゼカスパーゼ-8の動員を伴い、それによってカスパーゼカスケードが活性化され細胞死が起こる。RICKは、カスパーゼ様ドメインと相互作用するC末端「カスパーゼ動員」ドメインおよびN末端キナーゼ触媒ドメインとからなる。このことから、RICKがカスパーゼ-8の動員においてある役割を果たしていると思われる。この解釈は、ヒト293T細胞におけるRICKの発現がカスパーゼ-8の活性化を促進し、CD95アポトーシス経路に関与する様々なタンパク質によるアポトーシスの誘導を増強するという事実によって補強される (Inoharaら, 前出)。

【0023】

ミトコンドリアプロテインキナーゼ

原核生物ヒスチジンプロテインキナーゼに対する配列によって関連する真核生物キナーゼの新規のクラスであるミトコンドリアプロテインキナーゼ (MPK) は、他の真核生物プロテインキナーゼとは配列類似性を有していないようである。これらのプロテインキナーゼは、ミトコンドリアマトリックス空間のみに存在し、遺伝子真核細胞によって取り込まれた呼吸依存性細菌に存在した遺伝子が進化したものと思われる。MPKは、分枝鎖 ケト酸デヒドロゲナーゼおよびピルビン

酸デヒドロゲナーゼ複合体のリン酸化および不活化に関する (Harris, R. A. ら, (1995) Adv. Enzyme Regul. 34:147-162)。5つのMPKが同定された。4つのメンバーはピルビン酸デヒドロゲナーゼイソ酵素に対応し、解糖とクエン酸回路との中間において重要な調節酵素であるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性を調節する。5番目のメンバーは分枝鎖 ケト酸デヒドロゲナーゼキナーゼに対応し、分枝鎖アミノ酸の除去のための経路の調節に重要である (Harris, R. A. ら, (1997) Adv. Enzyme Regul. 37:271-293)。飢餓状態および糖尿病状態において、ラットの肝臓、心臓および筋肉におけるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの活性が著しく上昇することが知られている。この活性の上昇が、両方の病態におけるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のリン酸化および不活化、並びに糖新生のためのピルビン酸および乳酸の保存に貢献する (Harrisら, 前出)。

【0024】

(非タンパク質基質を用いるキナーゼ)

脂質キナーゼおよびイノシトールキナーゼ

脂質キナーゼは、脂質頭基上のヒドロキシル残基をリン酸化する。ホスファチジルイノシトール (PI) のリン酸化に関与するキナーゼのファミリーが記載されており、それぞれのメンバーがイノシトール環の特定の炭素をリン酸化する (Levers, S. ら, (1999) Curr. Opin. Cell. Biol. 11:219-225)。ホスファチジルイノシトールのリン酸化は、プロテインキナーゼCシグナル伝達経路の活性化に関与する。イノシトールホスホリピッド (ホスホイノシチド) 細胞内シグナル伝達経路は、細胞膜においてシグナル伝達分子がGタンパク質結合受容体に結合することによって始まる。これによって、イノシトールキナーゼによる細胞膜の内側のホスファチジルイノシトール (PI) 残基のリン酸化が起こり、それによってPI残基が二リン酸状態 (PIP_2) に変換される。次に PIP_2 がイノシトール三リン酸 (IP_3) およびジアシルグリセロールに切断される。これらの2つの生成物は、シグナル伝達経路を分けるためのメディエーターとして作用する。これらの経路によって仲介される細胞応答には、バソプレッシンに応答する肝臓におけるグリコーゲン分解、アセチルコリンに応答する平滑筋の収縮、およびトロンピン誘

導性血小板凝集がある。

【0025】

PIおよびその誘導体のD3位をリン酸化するPI3-キナーゼ (PI3K) は、細胞増殖、分化、および代謝に関する成長因子シグナルカスケードにおいて重要な役割を果たす。PI3Kは、アダプターサブユニットおよび触媒サブユニットからなるヘテロ二量体である。このアダプターサブユニットは足場タンパク質として作用し、特定のチロシン-リン酸化タンパク質、脂質成分、およびその他の細胞質因子と相互作用する。アダプターサブユニットがインスリン応答性基質 (IRS) -1などのチロシンリン酸化標的と結合すると、触媒サブユニットが活性化され、PI (4, 5) ニリン酸 (PIP₂)をPI (3, 4, 5) P₃ (PIP₃)に変換する。次にPIP₃が、PKA、プロテインキナーゼB (PKB)、プロテインキナーゼC (PKC)、グリコーゲンシンターゼキナーゼ (GSK) -3、およびP70リボソームS6キナーゼを含むその他の幾つかのタンパク質を活性化する。PI3Kもまた、細胞骨格形成タンパク質であるRac、rho、およびcdc42と直接相互作用する (Shepherd, P. R.ら, (1998) *Biochem. J.* 333:471-490)。obeseマウスおよびfatマウスなどの糖尿病動物モデルは、PI3kアダプターサブユニットのレベルが改変されている。アダプターサブユニットにおける特定の変異が、インスリン抵抗性のデンマーク人集団に見られることから、PI3Kが2型糖尿病においてある役割を果たしていると思われる (Shepherd, 前出)。

【0026】

脂質キナーゼリン酸化活性の例は、D-エリトロ-スフィンゴシンのスフィンゴ脂質代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸(SPP)へのリン酸化である。SPPは、細胞外作用および細胞内作用の両方を持つ新規の脂質セカンドメッセンジャーであることが分かった (Kohama, T.ら (1998) *J. Biol. Chem.* 273:23722-23728)。細胞外では、SPPはGタンパク質結合受容体EDG-1 (内皮由来Gタンパク質結合受容体) のリガンドである。細胞内では、SPPは、細胞の成長、生存、運動性、および細胞骨格の変化を調節する。SPPのレベルは、D-エリトロ-スフィンゴシンを特異的にリン酸化してSPPにするスフィンゴシンキナーゼによって調節される。細胞シグナル伝達におけるスフィンゴシンキナーゼの重要性は、血小板由来成

長因子 (PDGF)、神経成長因子、およびプロテインキナーゼCの活性化を含む様々な刺激が、スフィンゴシンキナーゼの活性化によりSPPの細胞内レベルを上昇させるという事実、および酵素の競合阻害剤がPDGFによって誘導された細胞増殖を選択的に阻害するという事実から証明された (Kohamaら, 前出)。

【0027】

プリンヌクレオチドキナーゼ

プリンヌクレオチドキナーゼであるアデニル酸キナーゼ (ATP: AMPホスホトランスフェラーゼ、もしくはAdK) およびグアニル酸キナーゼ (ATP: GMPホスホトランスフェラーゼ、もしくはGuK) が、ヌクレオチド代謝において重要な役割を果たし、ATPおよびGTPの合成および細胞内レベルの調節のそれぞれにおいて重要である。これらの2つの分子は、成長している細胞におけるDNA合成およびRNA合成の前駆物質であって、細胞における主な生化学エネルギーの主な供給源 (ATP) であり、シグナル伝達経路 (GTP) を提供する。これらの2つの分子の合成における様々なステップを妨げることが、癌および抗ウイルス治療のための多くの抗増殖剤の原理である (Pillwein, K.ら, (1990) Cancer Res. 50:1576-1579)。

。

【0028】

AdKはほとんどの細胞型に見られ、高い速度でATPを合成する骨格筋などの細胞に特に多く存在する。これらの細胞において、AdKは、細胞下構造であるミトコンドリアおよび筋原繊維と物理的に関連する。ミトコンドリアはエネルギーを生産し、筋原繊維はそのエネルギーを利用する。近年の研究により、ATPを生成する代謝プロセスからATPを消費する細胞成分への高エネルギーのホスホリルの転移においてAdKが重要な役割を果たしていることが実証された (Zeleznikar, R. J.ら, (1995) J. Biol. Chem. 270:7311-7319)。従って、AdKは、細胞、特に癌細胞などの増殖や代謝速度が速い細胞におけるエネルギー生産の維持において中心的な役割を演じると考えられ、ある種の癌の治療においてその活性を阻害するための候補を提供し得る。別法では、AdK活性の低下が、心不全や呼吸器不全を引き起こす様々な代謝筋エネルギー疾患の原因と考えられ、AdKの活性を上昇させて治療できるであろう。

【0029】

RNAおよびDNA合成のためのGTPの合成における重要なステップを提供するのに加えて、GuKはまた、GDPおよびGTPの調節によって細胞のシグナル伝達経路において重要な役割を果たす。具体的には、膜関連Gタンパク質に結合するGTPは細胞受容体の活性化を仲介し、アデニルシクラーゼが細胞内で活性化され、セカンドメッセンジャーであるサイクリックAMPが生産される。Gタンパク質に結合するGDPはこれらのプロセスを阻害する。また、GDPおよびGTPのレベルによって、細胞増殖の調節および発癌に関与するとして知られるp21^{ras}などのある種の腫瘍タンパク質の活性が調節される (Bos, J. L. (1989) *Cancer Res.* 49:4682-4689)。GuKの抑制によって起こるGDPに対するGTPの比率が高いと、p21^{ras}が活性化され発癌が促進される。GDPのレベルを上昇させGDPに対するGTPのレベルを低下させるためにGuKの活性を高めることが、発癌を抑制する治療となり得る。

【0030】

GuKは、ヘルペスウイルス感染の治療に有用なある種の抗ウイルス剤のリン酸化および活性化における重要な酵素である。これらの薬剤には、グアニン相同体アシクロビルおよびbuciclovirが含まれる (Miller, W. H.およびMiller R. L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:7204-7207 ; Stenberg, K.ら, (1986) *J. Biol. Chem.* 261:2134-2139)。感染細胞においてGuKの活性を高めることが、これらの薬剤の効果を促進させる治療方法となり得るため、薬剤の服用を減らすことが可能であろう。

【0031】

ピリミジンキナーゼ

ピリミジンキナーゼは、デオキシチジンキナーゼ、およびチミジンキナーゼ1および2を含む。デオキシチジンキナーゼは核に存在し、チミジンキナーゼ1および2は細胞質に見られる (Johansson, M.ら, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:11941-11945)。ピリミジンキナーゼによるデオキシリボヌクレオシドのリン酸化によって、DNA前駆物質のde novo合成のための代替の経路が提供される。リン酸化におけるピリミジンキナーゼの役割はプリンキナーゼと同様に、化学療法に重要な幾つかのヌクレオシド類似体の活性化に重要である (Arner

E. S.およびEriksson, S. (1995) Pharmacol. Ther. 67:155-186)。

【0032】

新規のヒトキナーゼ、およびそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。この新規の組成物は、癌、免疫疾患、成長および発達に影響を及ぼす疾患、心血管疾患、および脂質異常の診断・治療・予防において有用であり、また、ヒトキナーゼの核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の効果についての評価にも有用である。

【0033】

(発明の要約)

本発明は、総称して「PKIN」、個別にはそれぞれ「PKIN-1」、「PKIN-2」、「PKIN-3」、「PKIN-4」、「PKIN-5」、「PKIN-6」、「PKIN-7」、「PKIN-8」、「PKIN-9」、「PKIN-10」、「PKIN-11」、および「PKIN-12」と呼ぶキナーゼである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乃至21 (SEQ ID NO:1 - 12) からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。別法では、SEQ ID NO:1 - 12のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0034】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群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

されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたポリペプチドをコードする。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:13 - 24からなる一群から選択される。

【0035】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群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された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。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提供する。

【0036】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの生産方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドの発現に好適な条件下で、こ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された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ステップと、(b) このように発現したポリペプチドを回収するステップとを含む。

【0037】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 1

2からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群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された抗体を提供する。

【0038】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然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)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0039】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然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)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群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標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて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構成する少なくとも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ステップであって、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下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする、該ステップと、(b)前記ハイブリダイゼーション複合体の存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。別法では、前記プローブは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0040】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然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)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群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標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて、前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するステップと、(b)増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。

【0041】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む効果的な量のポリペプチド及び好適な医薬用賦形剤を含む組成物を提供する。一実施例では、SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は、患者にこの組成物を投与することを含む、機能的PKINの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0042】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで

構成される一群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) このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b) このサンプルのアゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的PKINの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0043】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群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) このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b) このサンプルのアンタゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアンタゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的PKINの過剰な発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【0044】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群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) このポリ

ペプチドを好適な条件下で少なくとも1つの化合物と結合させるステップと、(b)このポリペプチドとこの試験化合物との結合を検出して、このポリペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含む。

【0045】

更に本発明は、(a)SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b)SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c)SEQ ID NO:1-12からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d)SEQ ID NO:1-12とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群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調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a)このポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも1つの化合物と結合させるステップと、(b)この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性を評価するステップと、(c)この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性と、この試験化合物の不在下でのこのポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性の変化が、このポリペプチドの活性を調節する化合物の存在を示唆するという特徴を有する。

【0046】

更に本発明は、SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択された配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、(a)この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b)この標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップとを含む、該スクリーニング方法を提供する。

【0047】

本発明はさらに、試験化合物の毒性を評価する方法を提供する。この方法は、(a)核酸を含む生体サンプルを前記試験化合物で処理するステップと、(b)処理した前記生体サンプルの核酸をプローブとハイブリダイズするステップと、(c)ハイブリダイゼーション複合体の収量を測定するステップと、(d)前記

処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量を、未処理の生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量とを比較するステップとを含み、前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差異が試験化合物の毒性を示唆する。この方法における前記プローブは、(1) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3) 前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4) 前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5) 前記(1)乃至(4)のRNA等価物とで構成される一群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の連続する少なくとも20個のヌクレオチドを含む。また、前記ハイブリダイゼーションは、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われる。また、前記標的ポリヌクレオチドが、(1) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2) SEQ ID NO:13-24からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3) 前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4) 前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5) 前記(1)乃至(5)のRNA等価物とを含む。代替的に前記標的ポリヌクレオチドは前記ポリヌクレオチド配列の断片である。

【0048】

(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。

【0049】

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。

【0050】

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。

【0051】

(定義)

用語「PKIN」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PKINのアミノ酸配列を指す。

【0052】

用語「アゴニスト」は、PKINの生物学的活性を強める、或いは模倣する分子を指す。このアゴニストは、PKINに直接相互作用するか、或いはPKINが関与する生物学的経路の成分と作用して、PKIN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。

【0053】

用語「アレル変異配列」は、PKINをコードする遺伝子の別の形を指す。アレル変異配列は、核酸配列における少なくとも1つの変異によって生じ、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、天然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、又

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。

【0054】

PKINをコードする「変異」核酸配列は、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、PKINと同じポリペプチド或いはPKINの機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、PKINをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置でのアレル変異配列との不適当或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにPKIN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PKIN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PKIN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づいて成され得る。例えば、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。

【0055】

用語「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、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を指し、天然の分子及び合成分子を含む。「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子の配列を指す場合、「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。

【0056】

用語「増幅」は、核酸配列の複製物を作製することに関連する。一般に増幅は、この技術分野で周知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術によって行われる。

【0057】

用語「アンタゴニスト」は、PKIN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、PKINに直接相互作用するか、或いはPKINが関与する生物学的経路の成分と作用して、PKINの活性を調節する抗体、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。

【0058】

用語「抗体」は、抗原決定基と結合可能な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を指す。PKINポリペプチドと結合する抗体は、抗体を免疫する小ペプチドを含む無傷の分子またはその断片を用いて作製可能である。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、或いは化学的に合成可能であり、必要に応じて担体タンパク質と結合させ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、チログロブリン、及びキーホールリンペットヘモニアン（KLH）を含む。次ぎに、この結合したペプチドを用いて動物を免疫化する。

【0059】

用語「抗原決定基」は、特定の抗体と接触する分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質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。

【0060】

本明細書において「アンチセンス」は、特定の核酸配列のセンス（コーディング）鎖と塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス成分には、DNAと、RNAと、ペプチド核酸（PNA）と、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（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などの修飾された糖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天然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。

【0061】

用語「生物学的に活性」は、天然分子の構造的、調節的、或いは生化学的な機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然或いは組換え体のPKIN、合成のPKIN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を指す。

【0062】

用語「相補的」は、塩基対合によってアニールする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、配列「5'AGT3'」が相補的な配列「3'TCA5'」と対をなす。

【0063】

「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」は広い意味で、所定のヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を含む任意の組成物を指す。この組成物は、乾燥した製剤或いは水溶液を含み得る。PKIN若しくはPKIN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させることが可能である。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など）を含む水溶液に展開され得る。

【0064】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返す

返し行い、XL-PCRキット (PE Biosystems, Foster City CA) を用いて5'及び/または3'の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、またはGEL VIEW 断片構築システム (GCG, Madison, WI) またはPhrap (University of Washington, Seattle WA)等の断片構築用のコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上の重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長及び重複の両方によって構築されるコンセンサス配列もある。

【0065】

用語「保存的なアミノ酸置換」は、元のタンパク質の特性を殆ど変えない置換を指す。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る保存的なアミノ酸置換を示す。

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Set
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr

Tyr His, Phe, Trp

Val Ile, Leu, Thr

一般に、保存されたアミノ酸置換の場合は、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高次構造、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。

【0066】

用語「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基が欠如するアミノ酸配列の変化、或いは1個以上のヌクレオチドが欠如する核酸配列の変化を指す。

【0067】

用語「誘導体」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を指す。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の少なくとも1つを維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の少なくとも1つを維持する、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ポリペプチドのことである。

【0068】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成し得る、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するレポーター分子や酵素を指す。

【0069】

用語「断片」は、PKINまたはPKINをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列（parent sequence）と同一であるがその配列より長さが短いものを指す。「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である。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を含む。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断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500個の連続するヌクレオチド或いはアミノ酸残基の長さである。断片

は、優先的に分子の特定の領域から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若しくは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所定の長さを含み得る。これらの長さは一例であり、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。

【0070】

SEQ ID NO:13 - 24の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:13 - 24を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO:13 - 24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、またはSEQ ID NO:13 - 24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:13 - 24の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に測定できる。

【0071】

SEQ ID NO: 1 - 12のある断片は、SEQ ID NO: 13 - 24のある断片によってコードされる。SEQ ID NO: 1 - 12のある断片は、SEQ ID NO: 1 - 12を特異的に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 - 12のある断片は、SEQ ID NO: 1 - 12を特異的に認識する抗体の開発における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 - 12の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に決定できる。

【0072】

「完全長」ポリヌクレオチド配列とは、少なくとも1つの翻訳開始コドン（例えばメチオニン）、それに続くオープンリーディングフレーム及び翻訳終止コドンを有する配列である。「完全長」ポリヌクレオチド配列は、「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

【0073】

「相同性」は、2つ以上のポリヌクレオチド配列間または2つ以上のポリペプチド配列間の配列類似性である。この配列類似性は配列同一性と言い換えること

ができる。

【0074】

ポリヌクレオチド配列についての用語「パーセントの同一性」または「%の同一性」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる、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、より意味をもつ2つの配列間の比較を行うことができる。

【0075】

ポリヌクレオチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。このプログラムはLASERGENEソフトウェアパッケージの一部であり、分子生物学分析プログラム一式(DNASTAR, Madison WI)である。このCLUSTAL Vは、Higgins, D.G. 及び P.M. Sharp (1989) CABIOS 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。同一性のパーセントは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列間の「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0076】

別法では、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)が提供する、広く用いられている無料の配列比較アルゴリズム一式が、NCBI (Bethesda, MD) を含む幾つかのソース及びインターネット (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) で入手可能である。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と様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いられる「blastn」を含む、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、デフォルトを設定するギャップ及び他のパラメータと共に用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較する場合、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)で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。

【0077】

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、所定の配列の全長に対して測定してもよいし、それより短い長さに対して、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を用いて、同一性のパーセントが測定される長さを示すことができる。

【0078】

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によって類似のアミノ酸配列をコードし得る。縮重を利用して核酸配列を変え、それぞれが実質的に同じタンパク質をコードする様々な核酸配列を作製できることを理解されたい。

【0079】

ポリペプチド配列に用いられる用語「パーセントの同一性」または「%の同一性」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる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。詳細に上述したこのような保存的な置換は、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。

【0080】

ポリペプチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN バージョン3.12e配列アラインメントプログラム（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決定可能である。CLUSTAL Vを用い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、及び「diagonals saved」=5と設定する。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の同一性のパーセントは、「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0081】

別法では、NCBI BLASTソフトウェア一式が用いられる。例えば、2つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、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 (Apr-21-2000)で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。

【0082】

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、所定のポリペプチド配列の全長に対して測定してもよいし、それより短い長さに対して、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を用いて、同一性のパーセントが測定される長さを示すことができる。

【0083】

「ヒト人工染色体 (HAC)」は、約6 kb (キロベース) ~ 10 MbのサイズのDNA配列を含み得る、安定した有糸分裂染色体の分離及び維持に必要な全てのエレメントを含む直鎖状の小染色体である。

【0084】

用語「ヒト化抗体」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えられた抗体分子を指す。

【0085】

「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するアニーリングのプロセスである。特異的なハイブリダイゼーションとは、2つの核酸配列が高い相同性を有することを意味する。アニーリングが許容される条件下で、特異的な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即ちストリンジェンシー (stringency) の決定において特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異的な結合、即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合が減少する。核酸配列間のアニーリングが許容される条件は、当業者によって日常的に決定され、ハイブリダイゼーションの間は一定であるが、洗浄過程は、目的のストリンジェンシーにするためにその最中に条件の変更が可能であり、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、温度が68 で、約6 × SSC、約1% (w/v) のSDS、並びに約100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ のせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0086】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、洗浄過程を行う際の温度によっても左右される。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点(T_m)より約5~20 低く選択される。この T_m は、(所定のイオン強度とpHの下)標的の配列の50%が完全に一致するプローブとハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーションの条件は、周知であり、Sambrook, J. 他による, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版の1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainville NY; 特に2巻の9章に記載されている。

【0087】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約0.2x SSC及び約1%のSDSの存在の下、約68 度で1時間の洗浄過程を含む。別法では、65 、60 、55 、42 度の温度で行う。SSCの濃度は、約0.1%のSDSが存在の下、約0.1~2x SSCの範囲である。通常は、ブロッキング試薬を用いて非特異的なハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング試薬には、例えば、約100~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の切断され変性したサケ精子DNAが含まれる。約35~50%v/vの濃度のホルムアミドなどの有機溶剤が、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。これらの洗浄条件の有用な改変は、当業者には周知である。特に高いストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド間の進化における類似性を示唆し得る。このような類似性は、それらのヌクレオチド及びコードされたポリペプチドが類似の役割を果たしていることを強く示唆する。

【0088】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合によって、形成された2つの核酸配列の複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は溶液中(例えば、 C_0t または R_0t 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、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で形成され得る。

【0089】

用語「挿入」或いは「付加」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を指す。

【0090】

「免疫応答」は、炎症性疾患及び外傷、免疫異常、感染症、遺伝病などに関連する症状を指す。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という特徴をもつ。

【0091】

用語「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物などの生きている動物に導入すると、免疫反応を引き起こすGVREDのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」はまた、本明細書で開示するまたは当分野で周知のあらゆる抗体生産方法に有用なPKINのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

【0092】

用語「マイクロアレイ」は、基質上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物の構成を指す。

【0093】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ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その他の化合物を指す。

【0094】

用語「調節」は、PKINの活性の変化を指す。例えば、調節によって、PKINのタンパク質活性、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起こる。

【0095】

用語「核酸」及び「核酸配列」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリ

ヌクレオチド、或いはそれらの断片を指し、一本鎖若しくは二本鎖であって、センス鎖或いはアンチセンス鎖であるゲノム起源若しくは合成起源のDNA或いはRNA、ペプチド核酸(PNA)、任意のDNA様物質、及びRNA様物質である。

【0096】

「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状態を指す。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。一般に、機能的に結合したDNA配列は、同じ読み枠内で2つのタンパク質をコードする領域が結合する必要がある場合は、非常に近接或いは連続する。

【0097】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリシ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、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。この末端のリシンにより、この組成物が溶解性となる。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ける寿命を延ばし得る。

【0098】

PKINの「翻訳後修飾」には、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解性切断及びその他の当分野で既知の修飾を含まれ得る。これらのプロセスは、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、PKINの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。

【0099】

「プローブ」とは、同一配列或いはアレル核酸配列、関連する核酸配列の検出に用いる、PKIN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。「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リング可能な、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーがポリヌクレ

オチドにアニーリングした後、あるDNAポリメラーゼ酵素によって、標的のDNA一本鎖に沿って伸長される。プライマーの組は、例えば、PCR法における核酸配列の増幅（及び同定）に用いることができる。

【0100】

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を含む。特異性を高めるために、より長いプローブ及びプライマーが用いることも可能である。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のヌクレオチドを含む。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。

【0101】

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年、名称「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版の1-3巻(Cold Spring Harbor Press, Plainview NY)、またはAusubel, F.M.他による、1987年、名称「Current Protocols in Molecular Biology」(Greene Pubi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY)、並びに Innis他による、1990年、名称「PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications」(Academic Press, San Diego CA.)を参照されたい。PCR用のプライマーの組は、例えば、Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA)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引き出すことができる。

【0102】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、当分野で周知のプライマー選択用のコンピュータプログラムで選択される。例えば、OLIGO 4.06ソフトウェアは、それぞれが最大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最大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、ゲノムワイドスコープ (genome-wide scope) におけるプライマーの設計に有用である。Primer3プライマー選択プログラム (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MAより入手可能) によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ (mispriming library)」を入力できる。また、Primer3は、特にマイクロアレイのオリゴヌクレオチドの選択に有用である (後の方の2つのプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれのソースから得ることができ、ユーザーのニーズを満たすように変更することもできる)。PrimerGenプログラム (UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK より入手可能) は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計するため、アラインメントされた核酸配列の最も保存された領域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を選択することができる。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法やシーケンシングプライマー、マイクロアレイエレメント、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。

【0103】

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も多いが、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方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も含む。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場合もある。このような組換え核酸は、例えば、ある

細胞を形質転換するのに用いられるベクターの一部であり得る。

【0104】

別法では、このような組換え核酸は、この組換え核酸を発現する哺乳動物のワクチン接種に用いると、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。

【0105】

「調節エレメント」は、通常は遺伝子の非翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写や翻訳、または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。

【0106】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いられる化学的または生化学的な部分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分が含まれる。

【0107】

本明細書において、DNA配列に対する「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構成されるが、窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0108】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。PKIN、PKINをコードする核酸、またはその断片を含むと推定されるサンプルは、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、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリント等を含み得る。

【0109】

用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物との間の相互作用を指す。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」及び抗体を含む反応液に、エピトープAを含むポリペプチド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。

【0110】

用語「実質的に精製された」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組成物が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましくは90%以上除去されたものを指す。

【0111】

「置換」とは、一つ以上のアミノ酸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。

【0112】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルタ、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。

【0113】

「転写イメージ」は、所定条件下での所定時間における特定の細胞の種類または組織による集合的遺伝子発現のパターンを指す。

【0114】

「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下で起こり、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、これらに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。

【0115】

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を用いて、人間が生物の1つ以上の細胞に異種の核酸を導入した任意の生物であり、動物及び植物を含むが、こ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異種核酸を細胞に導入する。「遺伝子操作」とは、典型的な交雑育種や*in vitro*での受精ではなく、組換えDNA分子を導入することである。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、宿主に導入することができる。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。

【0116】

特定の核酸配列の「変異配列」とは、デフォルトパラメータ設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastnによって、ある核酸配列のある長さに対する該特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、ある長さにおいて、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。ある変異配列は、例えば、「アレル」変異配列(上述)または「スプライス」変異配列、「種」変異配列、「多型」変異配列と表すことができる。スプライス変異配列は基準分子と同一性が極めて高い可能性があるが、mRNAプロセッシング中のエキソンの択一的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追加の機能ドメインを有したり、

基準分子に存在する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。得られるポリペプチドは、互いに高いアミノ酸同一性を有する。多型変異配列は、所定の種と種における特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1ヌクレオチド多型」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば、或る集団、病態、病態の性向を示唆し得る。

【0117】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、デフォルトパラメータ設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastpによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定のポリペプチド配列の同一性が、少なくとも40%と決定されたポリペプチド配列のことである。このようなポリペプチドの対は、ある長さにおいて、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。

【0118】

(発明)

本発明は、新規のヒトキナーゼ(PKIN)及びPKINをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、これらの組成物を利用した癌、免疫疾患、成長および発達に影響を及ぼす疾患、心血管疾患、および脂質異常の診断、治療、及び予防に関する。

【0119】

表1は、本発明のポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の識別番号を示す。各ポリヌクレオチドおよびそれに対応するポリペプチドは、1つのインサイトプロジェクト識別番号(Incyte Project ID)に相関する。各ポリペプチド配列は、記載されているようにポリペプチド配列識別番号(Polypeptide SEQ ID NO:)およびインサイトポリペプチド配列番号(Incyte Polypeptide ID)の両方によって示されている。各ポリヌクレオチド配列は、記載されているようにポリヌクレオチド配列識別番号(Polypeptide SEQ ID NO:)およびインサイトポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte Polypeptide ID)の両方によって

示されている。

【0120】

表2は、GenBankタンパク質 (genept) データベースにおいてBLAST解析により同定された本発明のポリペプチドに相同性を有する配列を示す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号 (Polypeptide SEQ ID NO :) およびそれに対応するインサイトポリペプチド配列番号 (Incyte Polypeptide ID) を示す。列3は、GenBankの最も近い相同体のGenBankの識別番号 (Genbank ID NO :) を示す。列4は、各ポリペプチドとそのGenBank相同体との間の一致を表す確率スコアを示す。列5は、GwnBank相同体のアノテーションを示し、更に該当箇所には適当な引用文も示す。これらを引用することを以って本明細書の一部とする。

【0121】

表3は、本発明の各ポリペプチドの様々な構造的特徴を示す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドのポリペプチド配列識別番号 (SEQ ID NO :) およびそれに対応するインサイトポリペプチド配列番号 (Incyte Polypeptide ID) を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4および列5はそれぞれ、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム (Genetics Computer Group, Madison WI) によって決定された、潜在的なリン酸化部位および潜在的なグリコシル化部位を示す。列6は、シグネチャ (signature) 配列、ドメイン、およびモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列7は、タンパク質の構造 / 機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所にはさらに分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。

【0122】

表4に示されているように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列、またはゲノムDNA由来のコード (エキソン) 配列、或いはこれらの2種類の配列のあらゆる組み合わせを用いて組み立てた。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列識別番号 (Polynucleotide SEQ ID NO :) およびそれに対応するインサイトポリヌクレオチドコンセンサス配列番号 (Incyte Polynucleotide ID) を示す。列3は、塩基対における各ポリヌ

クレオチド配列の長さを示す。列4は、例えば、SEQ ID NO:13-24を同定するため、或いはSEQ ID NO:13-24と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用なポリヌクレオチド配列の断片を示す。列5は、cDNA配列、ゲノムDNAから推定されるコード配列（エキソン）、および/またはcDNAおよびゲノムDNAの両方からなる群に対応する識別番号を示す。これらの配列を用いて本発明の完全長ポリヌクレオチド配列を組み立てた。表4の列6および列7はそれぞれ、列5の配列に対応するcDNA配列およびゲノム配列の開始ヌクレオチド（5'）位置および終了ヌクレオチド（3'）位置を示す。

【0123】

表4の列5に示されている識別番号は、具体的には、例えばインサイトcDNAおよびそれらに対応するcDNAライブラリの識別番号を示す。例えば、2287966H1はインサイトcDNA配列の識別番号であり、BRAINON01はそれが由来するcDNAライブラリの識別番号である。cDNAライブラリが示されていないインサイトcDNAは、プールされているcDNAライブラリ（例えば、70166939V1）に由来する。または、列5の識別番号は、ポリヌクレオチド配列の組み立てに用いたGenBankのcDNAすなわちEST（例えば、g2821547）の識別番号の場合もある。または、列5の識別番号は、Genscan分析によって推定されるゲノムDNAのコード領域の場合もある。例えば、g4454511 v113. gs_3.nt. editは、Genscan推定コード配列の識別番号であって、g4454511がGenscan分析によって得られたGenBankの配列の識別番号である。このGenscan推定コード配列は、配列を組み立てる前に編集する場合がある（実施例4を参照）。または、列5の識別番号は、exon-stitchingアルゴリズムによってcDNAおよびGenscan推定エキソンの両方からなる群の場合もある（実施例5を参照）。または、列5の識別番号は、exon-stretchingアルゴリズムによってcDNAおよびGenscan推定エキソンの両方からなる群の場合もある（実施例5を参照）。場合によっては、列5に示されている配列の範囲と重複するインサイトcDNAの範囲が得られ、最終的なコンセンサス配列が決定されるが、それに相当するインサイトcDNAの識別番号は示されていない。

【0124】

表5は、インサイトcDNA配列を用いて組み立てられたこれらの完全長ポリヌクレオチド配列が由来する代表的なcDNAライブラリを示す。代表的なcDNAライブラリとは、上記ポリヌクレオチド配列の組み立ておよび決定に用いられたインサイトcDNA配列を最も多く含むインサイトcDNAライブラリのことである。表5に示されているcDNAライブラリを作製するために用いた組織およびベクターが表6に示されている。

【0125】

本発明はまた、PKINの変異体も含む。好適なPKINの変異体は、PKINの機能的或いは構造的特徴の少なくともどちらか一方を有し、かつPKINアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0126】

本発明はまた、PKINをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例において、本発明は、PKINをコードするSEQ ID NO:13-24からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。配列表に示したSEQ ID NO:13-24のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる等価RNA配列を含む。

【0127】

本発明はまた、PKIN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、PKINをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%も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:13-24からなる一群から選択された核酸配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するSEQ ID NO:13-24からなる一群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提供する。上記したポリヌクレオチド変異配列は何れも、PKIN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。

【0128】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るPKIN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、天然のPKIN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。

【0129】

PKINをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は一般に、好適に選択されたストリンジェントな条件下で、天然のPKINのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然のコドンを含めるなどの実質的に異なった使い方のコドンを含むPKIN或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作ることには有利となり得る。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また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、PKIN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、天然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。

【0130】

本発明はまた、PKIN及びその誘導体をコードするDNA配列また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、PKIN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。

【0131】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:13-24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。

【0132】

当分野で周知のDNAのシーケンシング方法を用いて、本発明の何れの実施例も実行可能である。この方法には、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、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, Gaithersburg 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。好ましくは、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200 Thermal Cycler200 (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800 (PE Biosystems) などの装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373或いは377 DNAシーケンシングシステム(PE Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム(Molecular Dynamics, Sunnyvale CA)または当分野で周知の他の方法を用いてシーケンシングを行う。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, pp. 856-853.を参照)。

【0133】

当分野で周知のPCR法をベースにした種々の方法で、部分的なヌクレオチド配列を利用して、PKINをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメント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入れ子プライマー (nested primer) 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.ら(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含量が50%以上、約68~72の温度で鋳型に対してアニーリングするよう設計される。

【0134】

完全長のcDNAをスクリーニングする場合は、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。

【0135】

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が

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。

【0136】

本発明の別の実施例では、PKIN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分子にクローニングして、適切な宿主細胞内にPKIN、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。遺伝暗号固有の縮重により、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PKINのクローン化及び発現に利用可能である。

【0137】

種々の目的でPKIN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、ヌ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媒介性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、コドン選択の変更、スプライスバリエーションの作製等が可能である。

【0138】

本発明のヌクレオチドを、MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; 米国特許第5,837,458号; 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シャフリング技術を用いてシャフリングして、PKIN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PKINの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャフリングは、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を作製するプロセスである。次に、このライブラリを、目的の特性を有する遺伝子変異体を同定するために選択或いはスクリーニングする。これらの好ま

しい変異体をプールし、DNAシャフリング及び選択/スクリーニングを繰り返す。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がある1つの遺伝子の断片を、目的の特性が最適化するまで、組換え及びスクリーニング、シャフリングを実施することもできる。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、それによってプロトコルに従った調節可能な方法で、多数の天然遺伝子の遺伝子多様性を最大にすることができる。

【0139】

別の実施例によれば、PKIN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.ら(1980) Nucl. Acids Res. 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PKIN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. 55-60; Roberge, J.Y.ら(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ー(PE Biosystems)を用いて達成し得る。更にPKIN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、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

【0140】

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ケンシングにより確認することができる(例えば、Creighton、前出、pp28-53を参照)。

【0141】

生物学的に活性なPKINを発現させるために、PKIN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ディング配列の転写及び翻訳の調節に必要なエレメントを含む。これらのエレメントには、ベクター及びPKIN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。このようなエレメントは、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、PKIN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。PKINをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれなければならない。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.* 201 - 18-162.を参照)。

【0142】

当業者に周知の方法を用いて、PKINをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節エレメント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, ch. 9章及び13章1 - 4章を参照)。

【0143】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、PKINをコードする配列の保持及び発現が可能である。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、前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509、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) EMBOJ. 6:307-311; The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196、Logan, J. and T. S henk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355を参照)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる (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. and N. Somia (1997) Nature 389:239-242等を参照)。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。

【0144】

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、PKIN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、PKIN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(Stratagene, La Jolla CA)またはpSPORT 1 プラスミド(G IBCO BRL)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PKIN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PKINが必要な場合は、PKIN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。

【0145】

PKINの発現に酵母の発現系の使用が可能である。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、酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは*Pichia pastoris*に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か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, G.A. ら (1987) Methods Enzymol.153:516-544、及びScorer, C. A. ら (1994) Bio/Technology 121 - 181 -184.を参照)。

【0146】

植物系もPKINの発現に使用可能である。PKIN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(例えば、Coruzzi, G. ら. (1984) EMBO J. 3 : 1671-1680 ; Broglie, R. ら (1984) Science 224 : 838-843 ; および Winter, J. ら (1991) Results Probl. Cell Differ. 17 : 85-105を参照)由来のオメガリーダー配列と組み合わせて促進される。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)。

【0147】

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PKIN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E 1またはE 3領域への挿入により、感染した宿主細胞にPKINを発現する生ウイルスを得ることが可能である (Logan, J. 及びShenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659を参照)。さらに、ラウス肉腫ウイルス (RSV) エンハンサー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。

【0148】

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6 kb ~ 10 MbのHACsを作製し、従来の輸送方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル) で供給する。(例えば、Harrington, J.J. 他 (1997) Nat Genet.15:345-355.を参照)。

【0149】

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PKIN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、PKIN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確実に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。

【0150】

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^rまたはapr^r細胞において使用される。(例えば、Wigler, M. 他

(1977) Cell 11:223-232; 及び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 (cPKINsulfuron)、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. 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. 85:8047-51を参照)。アノトシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質GUS、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られる。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. 55:121-131を参照)。

【0151】

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、PKIN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、PKIN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PKIN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。

【0152】

一般に、PKINをコードする核酸配列を含み、PKIN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。

【0153】

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PKINの発現の検出及び計測のための免疫学的な方法は、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。PKIN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 Laboratory Manual. APS Press, St Paul, MN, Sect. IV; Coligan, J. E. 他 Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; 及び Pound, J.D. (1990) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ)。

【0154】

種々の標識技術及び結合技術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。PKIN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、PKIN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 Corp (Cleveland OH) 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。

【0155】

PKIN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、細胞培地でこのタンパク質の発現及び回収に好適な条件下で培養される。形質転換された細胞から産生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。PKIN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透過するPKIN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。

【0156】

更に、挿入した配列の発現調節能力または発現したタンパク質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「プレプロ」または「プロ」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種類の宿主細胞 (例えば、CHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38) が American Type Culture Collection (ATCC; Bethesda, MD) 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。

【0157】

本発明の別の実施例では、PKIN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PKINタンパク質が、PKIN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、PKIN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、PKIN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。市販されている様々なキットを用いて、融合タンパク質の発現及び精製を促進できる。

【0158】

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PKIN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。

【0159】

本発明のPKINまたはその断片を用いて、PKINに特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。少なくとも1つまたは複数の試験化合物を用いて、PKINへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。試験化合物の例には、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質 (例えば受容体) または小分子が挙げられる。

【0160】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドやその断片などのPKINの天然のリガンド、または天然の基質、構造的または機能的な擬態性または自然結合パートナーに密接に関連している (Coligan, J.E. 他 (1991) Curr

ent Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様に、化合物は、PKINが結合する天然受容体、或いは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体のある断片に密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。一実施例では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてPKINを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、大腸菌からの細胞が含まれる。PKINを発現する細胞またはPKINを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、PKINまたは化合物の何れかの結合、刺激または阻害を分析する。

【0161】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、フルオロフォア、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたPKINと結合させるステップと、PKINとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出及び測定を行うことができる。更にこのアッセイでは、細胞遊離剤、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実施することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定させる。

【0162】

本発明のPKINまたはその断片を用いて、PKINの活性を調整する化合物をスクリーニングすることが可能である。このような化合物には、アゴニスト、アンタゴニスト、或るいは部分的または逆アゴニスト等が含まれる。一実施例では、PKINが少なくとも1つの試験化合物と結合する、PKINの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのPKINの活性が試験化合物不在下でのPKINの活性と比較する。試験化合物の存在下でのPKINの活性の変化は、PKINの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物をPKINの活性に適した条件下でPKINを含むin vitroまたは細胞遊離系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、PKINの活性を調整する試験化合物は間接

的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つから複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

【0163】

別の実施例では、胚性幹細胞（ES細胞）における相同組換えを用いて動物モデル系内で、PKINまたはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ノックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である（米国特許第5,175,383号及び第5,767,337号等を参照）。例えば129/SvJ細胞株等のマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292）等のマーカー遺伝子で破壊した目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。別法では、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に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）。形質転換したES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス系等から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒性薬剤で検査することができる。

【0164】

PKINをコードするポリヌクレオチドを*in vitro*でヒト胚盤胞由来のES細胞において操作することが可能である。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞の種類を含む少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統及び心筋細胞に分化する（Thomson, J.A. 他 (1998) Science 282:1145-1147）。

【0165】

PKINをコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ノックイン」ヒト化動物（ブタ）または遺伝子組換え動物（マウスまたはラット）を

作製することが可能である。ノックイン技術を用いて、PKINをコードするポリヌクレオチドの或る領域を動物ES細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について研究し、潜在的な医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばPKINを乳汁内に分泌するなどPKINを過剰に発現する哺乳動物近交系は、便利なタンパク質源となり得る (Janne, J. 他 (1998) *Biotechnol. Annu. Rev.* 4:55-74)。

【0166】

(治療)

PKINのある領域とヒトキナーゼのある領域との間に、例えば配列及びモチーフの文脈における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、PKINの発現は、癌、細胞増殖異常、および心血管疾患に密接に関連する。従って、PKINは、癌、免疫疾患、成長および発達に影響を及ぼす疾患、心血管疾患、および脂質異常においてある役割を果たすと考えられる。PKINの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、PKINの発現または活性を低下させることが望ましい。また、PKINの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、PKINの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0167】

従って、一実施例において、PKINの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にPKIN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癌、免疫疾患、成長および発達に影響を及ぼす疾患、心血管疾患、および脂質異常が含まれ、癌の中には腺癌及び白血病、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、甲状腺、子宮の癌、多発骨髄腫などの白血病、悪性リンパ腫などのリンパ腫が含まれ、免疫疾患の中には、炎症及び日光性角化症、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、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血

性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィー (APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、腓炎、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、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、成長および発達に影響を及ぼす疾患の中には日光性角化症及び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、甲状腺、子宮の癌や、尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ ベッカー型筋ジストロフィー、癩癧、性腺形成異常、WAGR症候群 (ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱)、スミス マジェニス症候群 (Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、舞蹈病 (Sydenham's chorea) 及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれ、心血管疾患の中には、動静脈瘻、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、静脈奇形、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術 (balloon angioplasty)、血管置換術 (vascular replacement)、大動脈冠動脈バイパス術移植手術 (coronary artery bypass graft surgery)、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗

塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化 (mitral annular calcification)、僧帽弁脱出、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、及び心臓移植の合併症と、先天性肺異常 (congenital lung anomalies)、肺拡張不全、肺うっ血及び肺水腫、肺動脈塞栓症、肺出血、肺梗塞、肺高血圧症、血管硬化症、閉塞性肺疾患、拘束性肺疾患 (restrictive pulmonary disease)、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、細気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎及びマイコプラズマ肺炎、肺膿瘍、肺結核、びまん性間質性疾患 (diffuse interstitial diseases)、塵肺症、サルコイド症、特発性肺繊維症 (idiopathic pulmonary fibrosis)、剥離性間質性肺炎、過敏症肺炎 (hypersensitivity pneumonitis)、肺好酸球増加閉塞性細気管支炎 器質性肺炎 (pulmonary eosinophilia bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia)、びまん性肺出血症候群 (diffuse pulmonary hemorrhage syndromes)、グッドパスチャー症候群、特発性肺血鉄症、肺併発膠原血管病 (pulmonary involvement in collagen-vascular disorders)、肺胞たんぱく症、肺腫瘍、炎症性及び非炎症性胸水 (inflammatory and noninflammatory pleural effusions)、気胸症、胸膜腫瘍、薬物による肺疾患 (drug-induced lung disease)、放射線による肺疾患 (radiation-induced lung disease) 及び肺移植の合併症などが含まれ、脂質異常の中には、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症 (carnitine palmitoyltransferase deficiency)、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症 (myoadenylate deaminase deficiency)、hypertriglyceridemia、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマン ピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、 G_{M2} にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異栄養症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフローゼ、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を

伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症 (primary hypoalphalipoproteinemia)、低甲状腺症 (hypothyroidism)、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠乏症、脳腱黄色腫症、シトステロール血症 (sitosterolemia)、低コレステロール血症、テイサックス病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。

【0168】

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PKINの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、PKIN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。

【0169】

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PKINの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたPKINを含む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。

【0170】

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PKINの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、PKINの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【0171】

更なる実施例では、PKINの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者にPKINのアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した癌、免疫疾患、成長および発達に影響を及ぼす疾患、心血管疾患、および脂質異常が含まれる。一実施態様では、PKIN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PKINを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング或いは運搬機構として間接的に用いられ得る。

【0172】

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PKINの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、PKINをコードする

ポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを患者に投与することも可能である。

【0173】

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。

【0174】

PKIN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PKIN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PKINと特異的に結合するものを同定が可能である。PKIN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、Fabフラグメント、及びFab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。

【0175】

抗体の産生のためには、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、PKINまたは任意の断片、または免疫原性の特性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。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。

【0176】

PKIN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、少なくとも約5個のアミノ酸からなり、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。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い。PKINアミノ酸の短いストレッチは、KLH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。

【0177】

PKIN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. ら. (1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D. ら. (1985) J. Immunol. Methods 81-8-42; Cote, R.J. ら. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030; Cole, S.P. ら. (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120を参照)。

【0178】

更に、「キメラ抗体」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. 81-4851-4855; Neuberger, M.S.他. (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.ら. (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、PKIN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の組成の抗体は、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)。

【0179】

抗体は、リンパ球集団の中のin vivo産生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また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、得ることもできる(例えば、Orlandi, R. 他. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3833-3837; Winter, G. 他. (1991) Nature 349:293-299を参照)。

【0180】

PKINに対する特異的な結合部位を含む抗体も得ることができる。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(ab')に断片と、F(ab')に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Fab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、Fab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Fab断片の迅速且つ容易な同定が可能となる(例えば、Huse, W.D. ら. (1989) Science 254:1275-1281を参照)。

【0181】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定する。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、PKIN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PKIN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一般に利用されるが、競合的結合アッセイも利用することができる(Pound、前出)。

【0182】

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、PKINに対する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PKIN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て得られる値である。多数のPKINエピトープに対して親和性が不均一なポリクローナル抗体医薬の K_a は、PKINに対する抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定のPKINエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体医薬の K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が $10^9 \sim 10^{12} \text{ L/mol}$ の高親和性抗体医薬は、PKIN抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに

用いるのが好ましい。Ka値が $10^6 \sim 10^7 \text{ L/mol}$ の低親和性抗体医薬は、PKIN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 1: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0183】

ある下流での適用におけるこのような医薬品の品質及び適性を調べるために、ポリクローナル抗体医薬の抗体価及び結合活性を更に評価する。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ーナル抗体医薬は一般に、PKIN抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。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)。

【0184】

本発明の別の実施例では、PKINをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、PKINをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子 (DNA及びRNA、修飾ヌクレオチド) を設計して遺伝子発現を変更することができる。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、PKIN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。

【0185】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に送達することができる (例えば、Slater, J.E. 他 (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475; and Scanlon, K.J. 他 (1995) 9(13):1288-1296. を参照)。また、アンチセンス配列は、例えばレトロウ

イルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる（例えば、Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271; Ausubel, 前出; Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347を参照）。その他の遺伝送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ、及び当分野で周知のその他の系が含まれる（Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J.他 (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315; and Morris, M.C. 他 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736.を参照）。

【0186】

本発明の別の実施例では、PKINをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療は、(i) 遺伝子欠損症（例えば、X染色体連鎖遺伝（Cavazzana-Calvo, M. 他 (2000) *Science* 288:669-672）によって特徴づけられる重度の複合型免疫欠損（SCID）-X1）、遺伝性アデノシン - デアミナーゼ（ADA）欠損症（Blaese, R.M. 他 (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C. 他 (1995) *Science* 270:470-475）に関連する重度の複合型免疫欠損、嚢胞性繊維症（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（thalassamia）、家族性高コレステロール血症、第VIII因子若しくは第IX因子欠損による血友病（Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410; Verma, I.M. and Somia, N. (1997) *Nature* 389:239-242）を治療したり、(ii) 条件的致死性遺伝子産物（例えば、細胞増殖の制御不能による癌の場合）を発現させたり、及び(iii) 細胞内の寄生虫（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）（Baltimore, D. (1988) *Nature* 335:395-396; Poeschla, E. 他 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11395-11399）や、B型若しくはC型肝炎ウイルス（HBV、HCV）、*Candida albicans* 及び *Paracoccidioides brasiliensis* 等の真菌寄生虫、*Plasmodium falciparum* 及び *Trypanosoma cruzi* 等の原虫寄生体）に対する防御機能を有するタンパク質を発現させて行うことができる。PKINの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からPKINを発現させて、遺伝

子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

【0187】

本発明の更なる実施例では、PKINの欠損による疾患や異常症は、PKINをコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってPKIN欠損細胞に導入することによって治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的な導入技術には、(i) 個々の細胞内へのDNAのマイクロインジェクション、(ii) 金粒子の打ち込み、(iii) リポソーム仲介性トランスフェクション、(iv) 受容体仲介性遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポソン (Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217; Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. and H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450) の使用が含まれる。

【0188】

PKINの発現に影響を及ぼし得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)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) が含まれる。PKINを発現させるために、(i) 恒常的に活性なプロモーター (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)、若しくは - アクチン遺伝子等)、(ii) 誘導性プロモーター (例えば、市販されているT-REXプラスミド (Invitrogen) に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター (Gossen, M. and 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. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、エクジソン誘導性プロモーター (市販されているプラスミドPVGRXR及びPINDに含まれている: Invitrogen)、FK506 / ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486 / ミフェプリストーン誘導性プロモーター (Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 前出)、または (iii) 正常な個体に由来するPKINをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

【0189】

市販のリポソーム形質転換キット（例えば、Invitrogenが販売しているPERFECT LIPID及びTRANSFECTION KIT）を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能である。別法では、リン酸カルシウム法（Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) *Virology* 52:456-467）若しくは電気穿孔法（Neumann, B. 他 (1982) *EMBO J.* 1:841-845）を用いて形質転換を行う。初代細胞にDNAを導入するためには、これらの標準的な哺乳動物トランスフェクションプロトコルを変更する必要がある。

【0190】

本発明の別の実施例では、PKINの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i) レトロウイルス末端反復配列（LTR）プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でPKINをコードするポリヌクレオチドと、(ii) 好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii) 追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコーディング配列を伴うRev応答性エレメント（RRE）とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター（例えば、PFB及びPFBNE0）はStratagene社から入手可能であり、公表データ（Riviere, I. 他. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:6733-6737）に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。このベクターは、VSVg（Armentano, D. 他 (1987) *J. Virol.* 61:1647-1650; Bender, M.A. 他 (1987) *J. Virol.* 61:1639-1646; Adam, M.A. and 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）等の乱交雑エンベロープタンパク質若しくは標的細胞上の受容体に対する親和性を有する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系（VPCL）において増殖される。RIGGに付与された米国特許第5,910,434号（「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」）において、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、ある細胞集団（例えば、CD

4⁺T細胞)の形質導入、並びに形質導入した細胞を患者に戻す方法は、遺伝子治療の分野では周知であり、多数の文献に記載されている(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)。

【0191】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、PKINの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にPKINをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングは当分野では周知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を脾臓の無損傷の脾島の中に導入するために可変性であることが証明された(Csete, M.E. 他. (1995) Transplantation 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターが、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また、Antinozzi, P.A. 他 (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544; and Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 18:389:239-242を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0192】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、PKINの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にPKINをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス(HSV)系のベクターは、HSV親和性の中枢神経細胞にPKINを導入する際に特に重要である。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは当分野では周知である。複製適格性の単純疱疹ウイルス(HSV)I型系のベクターは、霊長類の眼にレポーター遺伝子を送達するために用いられてきた(Liu, X. 他 (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製は、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号(Herpes simplex virus strains for gene transfer)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。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために、

好適なプロモーターのコントロールの下で、細胞に導入される少なくとも1つの内在性遺伝子を含むゲノムからなる組換えHSV d92についての記載がある。また上記特許には、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV株の作製及び使用方法が開示されている。HSVベクターについては、Goins, W.F. 他 (1999) J. Virol. 73:519-532 and Xu, H. 他 (1994) Dev. Biol. 163:152-161を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。クローニングされたヘルペスウイルス配列の操作や、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドをトランスフェクトした後の組換えウイルスの継代、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は当分野で周知の技術である。

【0193】

別法では、ウイルス（正の一本鎖RNAウイルス）ベクターを用いてPKINをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス（Semliki Forest Virus, SFV）の生物学的な研究が広範に行われ、遺伝子伝達ベクター（gene transfer vector）がSFVゲノムに基づいていることが分かった（Garoff, H. and K.-J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9:464-469）。ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスカプシドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。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されるため、酵素活性（例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ）を有するウイルスタンパク質に対してカプシドタンパク質が過剰に産生される。同様に、PKINをコードする配列をウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のPKINをコードするRNAが産生され、高いレベルでPKINが合成される。通常はウイルス感染は2～3日以内の細胞溶解に関係するが、シンドビスウイルス（SIN）の変異体を有するハムスターの正常な腎細胞（BHK-21）の持続的な感染を確立する能力は、ウイルスの溶解性の複製が遺伝子治療に適用できるように好適に変更することが可能であることを示唆している（Dryga, S.A. 他. (1997) *Virology* 228 :74-83）。様々な宿主にウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にPKINを導入することができる。ある集団における細胞のサブセットの特

定の形質導入には、形質導入する前に細胞のソーティングを必要とする場合がある。ウイルスの感染性cDNAクローンの操作、ウイルスcDNA及びRNAのトランスフェクション、並びにウイルスの感染方法は当分野で周知である。

【0194】

例えば開始部位から約 - 10 から約 + 10 までの転写開始部位に由来するオリゴヌクレオチドを用いて、遺伝子の発現を阻害することが可能である。同様に、三重らせん塩基対合法を用いて阻害することができる。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. ら. (1994) In: Huber, B.E. 及び B.I. Carr, Molecular and Immunological Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY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。

【0195】

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、PKIN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。

【0196】

任意の潜在的RNA標的内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、標的分子をスキャンニ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。

【0197】

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PKIN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。

【0198】

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、または分子のバックボーン内のホスホジエステル結合の代わりにホスホロチオネートまたは2' Oメチルを用いる修飾が含まれるが、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。

【0199】

本発明の更なる実施例は、PKINをコードするポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物には、限定するものではないが、特定のポリヌクレオチド配列と相互作用可能な非高分子化学物質、オリゴヌクレオチド、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、転写因子やその他のポリペプチド転写調節因子が含まれる。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビター或いはエンハンサーとして作用し、ポリヌクレオチドの発現を変化させ得る。従って、PKINの発現または活性の増加に関連する疾患の治療において

は、PKIN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が治療上有用であり、PKINの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、PKIN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が治療上有用であり得る。

【0200】

特定のポリヌクレオチドの発現の変化の有効性を調べるために、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングすることができる。試験化合物は、有効な化合物の化学修飾を含む当分野で周知の任意の方法で得ることができる。このような方法は、ポリヌクレオチドの発現を変化させる場合、一般に市販されている或いは専売の天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的特性に基づいて化合物を合理的にデザインする場合、更に組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効である。PKINをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも1つの試験化合物に曝露して得る。サンプルには、例えば無傷細胞、透過化処理した細胞、*in vitro*細胞遊離系または再構成生化学系が含まれ得る。PKINをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常、PKINをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特定のヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーションの収量を定量し、その値が1 或いは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較における基準となり得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現の変化が検出される場合は、ポリヌクレオチドの発現の変化に試験化合物が有効であることを示している。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物を調べるために、例えば*Schizosaccharomyces pombe* 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他 (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他 (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞株 (Clark e, M.L. 他 (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いてスクリーニングする。本発明の特定の実施例は、特異的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の、各オリゴヌクレオチド (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、及び修飾オリゴヌクレオチド)の組み合わせライブラリのスクリーニングを含む(Bruice, T.W. 他(1997)米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W. 他(2000)米国特許第6,022,691号)。

【0201】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用でき、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) Nature Biotechnology 15:462-66:を参照)。

【0202】

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

【0203】

本発明の別の実施例は、上記した全ての治療効果のために、医学上認められる担体と共に医薬品或いは無菌組成物の投与に関連する。このような組成物は、PKIN、PKINの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはPKINのインヒビターなどからなる。この組成物は、単体で、或いは安定剤などの1種類以上の別の薬剤と共に、無菌の生体適合性医薬品担体に投与することができる。このような医薬品担体には、生理食塩水、緩衝食塩水、ブドウ糖、及び水などが含まれるがこれらに限定されるものではない。この組成物は、単独或いは薬物またはホルモンなどの別の薬剤と共に投与することができる。

【0204】

本発明に用いられる組成物は、様々な経路を用いて投与するが可能である。この経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下、または直腸が含まれるがこれらに限定されるものではない。

【0205】

肺投与用の組成物は、液状または乾燥粉末状に調製することができる。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば、従来の低分子量有機薬剤）の場合には、速効製剤のエアロゾル輸送が当分野で周知である。高分子（例えばより大きなペプチドやタンパク質）の場合には、肺の肺胞領域を介する肺輸送の技術が近年向上したため、インスリン等の薬剤を実際に血中に輸送することが可能となった（Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射を用いなくて投与できるという点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーが必要でなくなる。

【0206】

本発明に用いる好適な組成物には、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、十分に自身の能力で効果的な服用量を定めることができる。

【0207】

PKINまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に輸送するべく、特殊な形態に組成物が調製されるのが好ましい。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、細胞融合及び高分子の細胞内輸送を促進し得る。別法では、PKINまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質の陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして作製された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入されることが確認されている（Schwarze, S.R. 他（1999）*Science* 285:1569-1572）。

【0208】

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、サル、また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、ヒトへの有益な薬用量及び投与経路を決定することができる。

【0209】

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PKINまたはそ

の断片、PKINの抗体、PKIN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用量）または LD_{50} （服用に対して集団の50%に致命的である用量）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。毒性効果と治療効果との薬用量比は治療指数であり、 LD_{50}/ED_{50} と示すことができる。高い治療指数を示す組成物が望ましい。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、投与の経路によって、この範囲内で様々である。

【0210】

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。作用期間が長い組成物は、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。

【0211】

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 μg 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ダ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、ポリヌクレオチドまた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。

【0212】

（診断）

別の実施例では、PKINに特異的に結合する抗体が、PKINの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはPKINやPKIN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。診断に有用な抗体は、治療のところで記載した方法と同じ方法で製剤される。PKIN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PKIN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。

【0213】

PKIN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PKIN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PKIN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、例えばヒトなどの被験者から採取した体液または細胞とPKIN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、測光法 (photometric) などの種々の方法で定量され得る。被験者のPKINの発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが基準値と比較される。基準値と被験者との間の偏差が、診断の指標となる。

【0214】

本発明の別の実施例によれば、PKIN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。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と相関し得るPKINを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出し定量する。この診断アッセイを用いて、PKINの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のPKIN値の調節を監視する。

【0215】

一実施形態では、PKIN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、PKIN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ストリンジェントは、プローブがPKIN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。

【0216】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、PKINをコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。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あるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO:13-24の配列、或いはPKIN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。

【0217】

PKIN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、PKIN及びPKIN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。

【0218】

PKINをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、PKIN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、このような疾患には癌、免疫疾患、成長および発達に影響を及ぼす疾患、心血管疾患、および脂質異常が含まれ、癌の中には腺癌及び白血病、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、甲状腺、子宮の癌、多発骨髄腫などの白血病

、悪性リンパ腫などのリンパ腫が含まれ、免疫疾患の中には、炎症及び日光性角化症、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、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィー（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、腓炎、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、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、成長および発達に影響を及ぼす疾患の中には日光性角化症及び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、甲状腺、子宮の癌や、尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ ベッカー型筋ジストロフィー、癩癧、性腺形成異常、WAGR症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱）、スミス マジェニス症候群（Smith-Magenis syndrome）、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、舞蹈病（Sydenham's chorea）及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれ、心血管疾患の中には、動静脈瘻、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、静脈奇形、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静

脈血栓、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術 (balloon angioplasty)、血管置換術 (vascular replacement)、大動脈冠動脈バイパス術移植手術 (coronary artery bypass graft surgery)、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化 (mitral annular calcification)、僧帽弁脱出、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、及び心臓移植の合併症と、先天性肺異常 (congenital lung anomalies)、肺拡張不全、肺うっ血及び肺水腫、肺動脈塞栓症、肺出血、肺梗塞、肺高血圧症、血管硬化症、閉塞性肺疾患、拘束性肺疾患 (restrictive pulmonary disease)、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、細気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎及びマイコプラズマ肺炎、肺膿瘍、肺結核、びまん性間質性疾患 (diffuse interstitial diseases)、塵肺症、サルコイド症、特発性肺繊維症 (idiopathic pulmonary fibrosis)、剥離性間質性肺炎、過敏症肺炎 (hypersensitivity pneumonitis)、肺好酸球増加閉塞性細気管支炎 器質性肺炎 (pulmonary eosinophilia bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia)、びまん性肺出血症候群 (diffuse pulmonary hemorrhage syndromes)、グッドパスチャー症候群、特発性肺血鉄症、肺併発膠原血管病 (pulmonary involvement in collagen-vascular disorders)、肺胞たんぱく症、肺腫瘍、炎症性及び非炎症性胸水 (inflammatory and noninflammatory pleural effusions)、気胸症、胸膜腫瘍、薬物による肺疾患 (drug-induced lung disease)、放射線による肺疾患 (radiation-induced lung disease) 及び肺移植の合併症などが含まれ、脂質異常の中には、脂肪肝、胆汁うっ滞、原発性胆汁性肝硬変、カルニチン欠乏症、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠乏症 (carnitine palmitoyltransferase deficiency)、ミオアデニレートデミナーゼ欠乏症 (myoadenylate deaminase deficiency)、hypertriglyceridemia、ファブリー病などの脂質貯蔵病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、変染色性白質ジストロフィー、副腎性白質ジストロフィー、 G_M2 にガングリオシドーシス、セロイドリポフスチン症、無リポ蛋白血症、タ

ンジアー病、リポ蛋白過剰血症、糖尿病、脂肪異常症、脂肪腫症、急性皮下脂肪組織炎、播種性脂肪組織壊死症、有痛脂肪症、リポイド副腎過形成、リポイドネフローゼ、脂肪腫、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症を伴った高コレステロール血症、原発性低リポ蛋白血症 (primary hypoalphalipoproteinemia)、低甲状腺症 (hypothyroidism)、腎臓病、肝疾患、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ欠乏症、脳腱黄色腫症、シトステロール血症 (sitosterolemia)、低コレステロール血症、テイサク病、サンドホフ病、高脂血症、脂肪過剰血症、脂質筋障害、肥満症が含まれる。MADをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法やノーザン法、ドットプロット法、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式アッセイ、及び変異PKINの発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用す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。

【0219】

ある実施態様では、PKIN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。PKIN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基準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が、制御サンプルと比べて著しく変わっている場合は、サンプル内のPKIN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。

【0220】

PKINの発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロファイルが確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件の下、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、PKIN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。基準値と被験者の値との偏差を用いて罹患しているかどうかを決定する。

【0221】

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。

【0222】

癌では、個体からの生体組織における異常な量の転写物が、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。

【0223】

PKIN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PKINをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはPKIN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、やや緩いストリンジェントな条件の下、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。

【0224】

或る実施態様において、PKINをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、一塩基多型 (SNP) を検出し得る。SNPは、ヒ

トの先天性または後天性遺伝病の原因となる場合が多いヌクレオチドの置換、挿入及び欠失である。限定するものではないが、SNPの検出方法には、一本鎖立体構造多型 (SSCP) 及び蛍光SSCP (fSSCP) 法が含まれる。SSCPでは、PKINをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) でDNAを増幅する。このDNAは、例えば病変或いは正常な組織、生検サンプル、体液等に由来し得る。このDNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR産物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。この差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光標識することによって、DNAシーケンシング装置などのハイスループット機器でアンプリマー (amplimer) の検出をすることが可能になる。更に、インシリコSNP (in silico SNP : isSNP) と呼ばれる配列データベース分析法は、共通のコンセンサス配列の構築に用いられる個々の重複するDNA断片の配列を比較することによって、多型を同定することができる。これらのコンピュータベースの方法は、DNA配列クロマトグラムの自動分析及び統計モデルを用いたシーケンシングエラーや研究室でのDNAの調整に起因する配列のばらつきを排除する。別法では、例えばハイスループットのMASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0225】

PKIN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.ら(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-44 ; Duplaa, C.ら(1993) Anal. Biochem. 229-236を参照)。多数のサンプルの定量速度は、ハイスループット型のアッセイを用いることで速くなるであろう。このアッセイでは、目的のオリゴマーやポリヌクレオチドが様々な希釈液中に含まれ、分光光度法或いは非色応答によって定量が迅速である。

【0226】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列に由来するオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおける標的と

して用いることができる。マイクロアレイを、上記したように多数の遺伝子の相対的な発現レベルを同時にモニタリングする転写イメージング技術に用いることができる。マイクロアレイはまた、遺伝子変異、突然変異及び多型の同定に用いることができる。この情報を用いて、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を解明し、疾患を診断し、遺伝子発現に関連する疾病の進行/後退をモニタリングし、疾患の治療における治療薬の開発や活性のモニタリングを行うことができる。特に、患者にとって最適かつ有効な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを作成することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づいて、患者に対して極めて効果的でありながら副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0227】

別の実施例では、PKIN、PKINの断片、PKINに特異的な抗体をマイクロアレイ上のエレメントとして用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようにタンパク質間相互作用、薬剤 - 標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニタリング及び測定することが可能である。

【0228】

特定の実施例は、或る組織または細胞型の転写イメージを生成する本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞型により遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所定の条件下で所定の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析される (Seilliamer 他、米国特許第5,840,484号の "Comparative Gene Transcript Analysis" を参照。この特許に言及することを以って本明細書の一部とする)。従って、特定の組織または細胞型の転写物または逆転写物の全てに本発明のポリヌクレオチドまたはその相補配列をハイブリダイズすることにより、転写イメージが生成され得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその相補配列がマイクロアレイ上に複数のエレメントのサブセットを構成するハイスループット型でハイブリダイゼーションさせる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロファイルとなり得る。

【0229】

転写イメージは、組織、細胞株、生検サンプル、またはその他の生体サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。従って、転写イメージは、組織または生検サンプルの場合にはin vivo、または細胞株の場合にはin vitroにおける遺伝子発現を反映する。

【0230】

本発明のポリヌクレオチドの発現プロファイルを示す転写イメージはまた、合成化合物または天然化合物の毒性試験のみならず、in vitroモデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用され得る。全ての化合物は、作用及び毒性の機構を示唆する、頻繁に分子フィンガープリント若しくは毒性シグネチャ(signature)と称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを引き起こす(Nuwaysir, E.F. 他(1999) Mol. Carcinog. 24:153-159、Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、また言及することを以って本明細書の一部とする)。試験化合物が、毒性を有する既知の化合物のシグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、毒性特性を共有している可能性が高い。フィンガープリンまたはシグネチャが、より多くの遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいれば、より有用かつ正確になる。理想としては、発現のゲノム全域にわたって測定し、最高品質のシグネチャを提供することである。任意の試験化合物によっても発現が変化しない遺伝子も同様に重要である。それは、これらの遺伝子の発現レベルを用いて残りの発現データを標準化することができるためである。標準化処理は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャのエLEMENTへの遺伝子機能を割り当てることは毒性機構の解明に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的な一致には遺伝子機能の知識は必要ではない(例えば2000年2月29日にNational Institute of Environmental Health Sciencesより発行されたPress Release 00-02を参照されたい。これについては<http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>で入手可能である)。従って、毒性シグネチャを用いる毒性スクリーニングにおいて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要でありまた望ましいことである。

【0231】

一実施例では、試験化合物の毒性は、核酸を含有する生体サンプルをその試験化合物で処理して評価する。処理した生体サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1若しくは複数のプローブでハイブリダイズさせ、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写レベルを定量することができる。処理した生体サンプル中の転写レベルを、非処理生体サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写レベルの差が、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示唆する。

【0232】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞型のプロテオームを分析することに関連する。「プロテオーム」という用語は、或る特定の組織または細胞型におけるタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームを構成する各タンパク質は、個々に更なる分析をすることができる。プロテオーム発現パターン即ちプロファイルは、所定の条件下で所定の時間に発現したタンパク質の数及びそれらの相対的な存在量を定量することにより分析する。従って、ある細胞のプロテオームのプロファイルは、特定の組織または細胞型のポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、このような分離は2次元ゲル電気泳動によって行う。この2次元ゲル電気泳動法では、まず、1次元の等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、次に、2次元のドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に従って分離する(前出のSteiner and Anderson)。これらのタンパク質は、通常クーマシーブルーまたはシルバーまたは蛍光染色などの染色剤を用いてゲルを染色して、分散した個別の位置にあるスポットとしてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理済みまたは未処理のいずれかの生体サンプルから得られる等位置にあるタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を調べる。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的に切断した後、質量分析する標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。スポット内のタンパク質の同一性は、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基であるその部分的な配列を、本発明の

ポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列が得られる。

【0233】

プロテオームのプロファイルは、PKINに特異的な抗体を用いてPKIN発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施例では、マイクロアレイ上のエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝露して各アレイエレメントへのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する (Lueking, A. ら. (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111、Mendoza, L.G. ら. (1999) *Biotechniques* 27:778-788)。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオール反応性またはアミノ反応性蛍光化合物を用いてサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

【0234】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性シグネチャと並行して分析するべきである。或る組織における或るタンパク質では、転写物の存在量とタンパク質の存在量との相関性が低いことがあるため (Anderson, N.L. and J. Seilhamer (1997) *Electrophoresis* 18:533-537)、プロテオーム毒性シグネチャは、転写イメージにはそれ程影響しないがプロテオームのプロファイルを変化させる化合物の分析において有用たり得る。更に、体液中での転写の分析は、mRNAが急速に分解するため困難である。しがたがって、このような場合にはプロテオームのプロファイル作成はより信頼でき、情報価値がある。

【0235】

別の実施例では、試験化合物の毒性は、タンパク質を含む生体サンプルをその試験化合物で処理して評価する。処理された生体サンプル中で発現したタンパク質を分離して、各タンパク質の量が定量できるようにする。各タンパク質の量を、未処理生体サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプル中のタンパク質の量の差は、処理されたサンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示唆する。個々のタンパク質は、それらのアミノ酸残基をシーケンシングし、

これらの部分配列を本発明のポリペプチドと比較することで同定する。

【0236】

別の実施例では、試験化合物の毒性は、タンパク質を含む生体サンプルをその試験化合物で処理することにより評価する。生体サンプルから得たタンパク質を、本発明のポリペプチドに特異的な抗体と共にインキュベートする。その抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生体サンプル中のタンパク質の量を、未処理生体サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差が、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示唆する。

。

【0237】

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. 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. 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、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。また、この文献を引用することを以って本明細書の一部とする。

【0238】

本発明の別の実施例ではまた、PKINをコードする核酸配列を用いて、天然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。コーディング配列または非コーディング配列の何れかを用いることができるが、或る例では、コーディング配列より非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー間にコーディング配列が保存されていることにより、染色体マッピング時に望ましくない交差ハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。この配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工の染色体、例えば、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対して

マッピングされる (Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154等を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて、例えば病状の遺伝と特定の染色体領域やまたは制限断片長多型 (RFLP) の遺伝とが相関するような遺伝子連鎖地図を作成可能である (Lander, E.S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。

【0239】

in situ蛍光ハイブリダイゼーション (FISH) は、他の物理的及び遺伝子地図データと相関し得る (例えば、Heinz-Ulrich, 他による(1995) in Meyers, 前出, pp. 965-968を参照)。遺伝子地図データの例は、種々の科学誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のワールドワイドウェブのサイトで見付けることができる。物理的な染色体地図上のPKIN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連するDNA領域の決定に役立つため、更なる位置を決定するクローニングが行われる。

【0240】

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、遺伝子地図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に遺伝子を配置させることにより、たとえ正確なヒト染色体の位置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場合が多い。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1つ或いは複数の遺伝子の位置が、例えば血管拡張性失調症の11q22-23などの特定の遺伝子領域に遺伝子結合によって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、さらなる調査のための関連する遺伝子或いは調節遺伝子を表す (例えば、Gatti, R.A.他による(1988) Nature 336:577-580を参照)。また、目的の本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者、保有者、即ち感染者の間の、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ある。

【0241】

本発明の別の実施例では、PKIN、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。PKINと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

【0242】

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、相当な数の異なる小さな試験用化合物が、プラスチックピン或いは他の基板の上に合成される。試験用化合物は、PKIN、或いはその断片と反応してから洗浄される。次に、結合されたPKINが、当分野で周知の方法で検出される。精製されたPKIN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。

【0243】

別の実施例では、PKINと結合可能な中和抗体がPKIN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、PKIN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。

【0244】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にPKIN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。

【0245】

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最大限に本

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好適な実施例は、例示目的であって本発明を限定するものではない。

【0246】

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第60/172,066号、同第60/176,107号、同第60/177,731号、および同第60/178,573号に言及することをもって本明細書の一部とする。

【0247】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

インサイトcDNAはLIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA)に含まれているcDNAライブラリに由来し、表4の列5に示されている。SEQ ID NO:13として示されているインサイトcDNAは、筋骨格組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。SEQ ID NO:14のインサイトcDNAは、脳腫瘍、前立腺癌、および甲状腺癌に関連する組織を含む前立腺組織、脳組織、および卵巣組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。組織の一部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する一方、この組織の別の一部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によって、或い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。

【0248】

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, Valencia 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。

【0249】

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SUPERSCRIP^T プラスミドシステム(Life Technologies)を用いて当分野で周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。PBLUESCRIP^T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)、PBK-CMVプラスミド(Stratagene)、pINCYプラスミド(Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)、またはそれらの誘導體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導入し組み込んだ。

【0250】

2 cDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したように得たプラスミドを、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)或いは細胞溶解を利用したin vivo切除によって宿主細胞から回収した。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プラスミドキットの内の少なくとも1つを用いてプラスミドを精製した。沈殿させた後、0.1ml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。

【0251】

別法では、ハイスループットの直接結合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 - ウェ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(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光定量的に測定した。

【0252】

3 シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したインサイトcDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンシング反応は標準的な方法で行うか、またはHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific)或いはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体移送装置と共にABI CATALYST 800 (PE Biosystems) サーマルサイクラー或いはPTC-200 thermal cycler (MJ Research)などのハイスループット装置を用いて行った。cDNAのシークエンシング反応は、Amersham Pharmacia Biotech社の試薬、またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(PE Biosystems)などのABIシークエンシングキットに含まれる試薬を用いて行った。cDNAシークエンシングの反応物の電気泳動的による分離及び標識したポリヌクレオチドの検出は、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Molecular Dynamics)、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム(PE Biosystems)、または当分野で周知のその他の配列解析システムを用いて行った。cDNA配列内の読み枠は、標準的な方法(Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例8に記載した方法で配列を伸長した。

【0253】

インサイトcDNAに由来する本ポリヌクレオチド配列の確認は、BLAST、動的プログラミング、およびジヌクレオチドの分布による解析(dinucleotide nearest neighbor analysis)に基づいたプログラム及びアルゴリズムを用いて、ベクター、リンカー、およびポリA配列を取り除き、更にあいまいな塩基対をマスクすることで行った。次に、インサイトcDNA配列およびそれらの翻訳を、公共のデー

データベースであるGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、および真核生物のデータベース、およびBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM、およびPFAMなどの隠れマルコフモデル(HMM)を基にしたタンパク質ファミリーのデータベースから選択した配列に対して問合せた(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス主構造を分析する確率的手法である。例えば、Eddy, S. R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 : 361-365を参照)。このような問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS、およびHMMRに基づいたプログラムを用いて行った。インサイトcDNA配列を組み立てて、完全長ポリヌクレオチド配列を作製した。或いは、GenBank cDNAs、GenBank EST、ステッチ配列(stitched sequence)、ストレッチ配列(stretched sequences)、またはGenscan-推定コード配列(実施例4および5を参照)を用いて、インサイトcDNA群を完全長の配列に伸長した。配列の組み立ては、Phred、Phrap、およびConsedに基づいたプログラムを用いて行い、GeneMark、BLAST、およびFASTAに基づいたプログラムを用いて、オープンリーディングフレームを決定するべくcDNA群をスクリーニングした。完全長のポリヌクレオチド配列を翻訳して対応する完全長ポリペプチド配列を得た。別法では、本発明のポリヌクレオチドは、完全長翻訳ポリヌクレオチドの任意のメチオニン残基から始まり得る。次に、完全長ポリペプチド配列をGenBankタンパク質データベース(genpept)、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM、Prosite、およびPFAMなどの隠れマルコフモデル(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せて分析した。これらの完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア(Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA)およびLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて分析した。ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列のアラインメントを、アラインメントした配列間のパーセント同一性も計算するMEGALIGNマルチシーケンスアラインメントプログラム(DNASTAR)に組み込まれたCLUSTALアルゴリズムによって指定されたデフォルトパラメータを用いて作成した。

【0254】

表7は、インサイトcDNAおよび完全長配列の組み立て、および組み立てた配列の分析に利用したツール、プログラム、およびアルゴリズム、並びにそれらの説

明、引用文献、閾値パラメータを簡単に示す。表7の列1は用いたツール、プログラム、およびアルゴリズム、列2はそれらの簡単な説明、列3は引用することで本明細書の一部とした引用文献、列4の記載されている部分は2つの配列の一致の程度を評価するために用いたスコア、確率値、およびその他のパラメータを示す（スコアが高くなれば高くなるほど即ち確率値が低ければ低いほど、配列間の相同性が高くなる）。

【0255】

完全長のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の組み立て及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:13-24のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20～約4000ヌクレオチドの断片を表4の列4に示した。

【0256】

4 ゲノムDNA由来のコード配列の同定および編集

推定ヒトキナーゼは、公共のゲノム配列データベース（例えば、gbpriやgbhtg）においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Genscanは、様々な生物に由来するゲノムDNA配列を分析するための汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. および S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268 : 78-94, Burge, C. および S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 346-354を参照）。このプログラムは推定エキソンを連結して、メチオニンから停止コドンまで伸長した組み立てcDNA配列を構築する。Genscanにより得られる配列は、FASTAデータベースのポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列になる。Genscanによって一回で解析できる配列の最大長さは30kbに設定されている。これらのGenscan推定cDNA配列の内、どの配列がヒトキナーゼをコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドをPFAMモデルにおいてキナーゼについて問合せて分析した（7tm_1、7tm_2、7tm_3、および7tm_4）。潜在的なヒトキナーゼが、キナーゼとしてアノテーションが付けられたインサイトcDNA配列に対する相同性を基に同定された。次に、これらの選択されたGenscan推定配列を、BLAST解析を用いてgeneptおよびgbpri公共データベースの配列と比較した。必要に応じて、Genscan推定cDNA配列を、geneptにおいてBLASTで最もヒットした配列と

比較して、Genscan推定配列における余分なエキソンや省いてしまったエキソンなどのエラーを修正し、編集した。BLAST解析を用いてGenscan推定cDNA配列を含むインサイトcDNAまたは公共のcDNAを見つけ出すことにより、転写の証拠が得られる。インサイトcDNAがGenscan推定cDNA配列を含む場合、この情報を用いてGenscan推定配列を修正或いは確認できる。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に説明した組み立て方法でGenscan推定コード配列とインサイトcDNAおよび/または公共のcDNA配列を組み立てて作製した。別法では、完全長ポリヌクレオチド配列は、その全てが編集した或いは未編集のGenscan推定コード配列から作製した。

【0257】

5 ゲノム配列データとcDNA配列データとの組み立て

ステッチ配列 (Stitched Sequence)

部分的なcDNA配列を、実施例4に記載したGenscan遺伝子同定プログラムによって推定されたエキソンで伸長した。実施例3に記載されたように組み立てられた部分的なcDNAをゲノムDNAにマッピングし、関連するcDNAおよび1或いは複数のゲノム配列に由来する関連する推定Genscanエキソンを含む複数のクラスターに入れた。各クラスターを、グラフ理論および動的計画法に基づいたアルゴリズムを用いて、cDNAおよびゲノム情報を統合して分析し、後に確認される潜在的なスプライスバリエーションを生成し、編集或いは伸長して完全長の配列を作製した。或るクラスターの2つ以上の配列に或る区間の全長が存在する配列区間を同定し、推移 (transitivity) により同定した区間を同等と考える。例えば、或る区間がcDNAおよび2つのゲノム配列のそれぞれに存在する場合、これら3つ全ての区間を同等と考える。この方法によって、関連しないが連続するゲノム配列をcDNA配列によって繋ぎ1つにする。このようにして同定された区間を、親配列 (parent sequence) に沿って現われるようにステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列および変異配列を作製する。或るタイプ (cDNAとcDNA、またはゲノム配列とゲノム配列) の親配列に沿って連結される区間と区間との繋ぎ合わせは、親配列のタイプが異なる (cDNAとゲノム配列) 連結より好ましい。得られたステッチ配列を翻訳し、BLAST解析でgenpeptおよびgbpri公共データベースに

おける配列と比較した。Genscanによって推定された不適当なエキソンを、genep tにおいてBLASTで最もヒットした配列と比較して修正する。このような配列を更なるcDNA配列で伸長し、必要に応じてゲノムDNAで検査した。

【0258】

ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

部分的なDNA配列をBLAST解析に基づいたアルゴリズムで完全長に伸長した。まず、実施例3に記載したように組み立てた部分的なcDNAを、BLASTプログラムを用いてGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、および真核生物のデータベースなどの公共のデータベースに対して問い合わせた。次に、GenBankの相同性の最も高いタンパク質を、実施例4に記載したインサイトcDNA或いはGenScanエキソン推定配列の何れかと比較した。得られた複数の高スコアのセグメント対 (HSP) を用いてキメラタンパク質を作製し、GenBankの相同タンパク質上に翻訳した配列をマッピングした。元のGenBankの相同タンパク質に対して、キメラタンパク質に挿入や欠失が起こり得る。公共のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を探し出すために、GenBankの相同タンパク質およびキメラタンパク質の両方をプローブとして用いた。このようにして、部分的なDNA配列を相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。完全な遺伝子を含んでいるか得られたストレッチ配列を検査した。

【0259】

6 PKIN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:13 - 24を組み立てるために用いた配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、インサイト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:13 - 24と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap (表7) などの構築アルゴリズムを使用して、連続及び重複した配列のクラスターに組み入れた。Stanford Human Genome Center (SHGC)、Whitehead Institute for Genome Research (WIGR)及びGenethonなどの公共の情報源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のデータを用いて、クラスター化した配列がすでにマッピングされているかを調べる。クラスターにマッピングされた配列が含まれている場合は、そのクラ

スターの全ての配列(特定のSEQ ID NOを含む)をそのマッピング位置に割り当てた。

【0260】

遺伝子地図の位置は、範囲、区間、またはヒト染色体によって表される。センチモルガンで示したマッピング位置の範囲は、染色体の短腕(p)の末端から測定した(センチモルガン(cM)は、同一染色体上の遺伝子間の乗換え率に基づいた距離を表す単位である。平均すると、1 cMはヒトの染色体の1メガベースに概ね等しいが、組換え率の高い部分と低い部分があるため、大きく変化し得る)。距離cMは、配列がそれぞれのクラスターに含まれている放射線ハイブリッドマーカーの境界を検出できるGenethonによってマッピングされた遺伝子マーカーに基づいている。NCBI「GeneMap99」(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap>)などの公衆が入手可能なヒト遺伝子マップおよびその他の情報源を用いて、上記した区間が既に同定されている疾患遺伝子マップ内若しくは近傍に位置するかを決定できる。

【0261】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

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)。

【0262】

BLASTに用いる類似のコンピュータ技術を用いて、GenBank或いはLIFESEQ (Incyte Pharmaceuticals) のようなcDNA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、

【0263】

【数1】

(BLAST スコア×配列一致率)

$$5 \times (\text{長さ(配列1)}, \text{長さ(配列2)}) \text{の最小値}$$

として定義される積スコアである。積スコアは、0～100の標準化された値であり、以下のように求める。BLASTスコアにヌクレオチド配列の一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアのセグメントの対(HSP)において一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不適性塩基対に-4を割り当てることにより、BLASTスコアを計算する。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る(ギャップにより離隔される)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアの塩基対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、BLASTアラインメントの断片的重複と質とのバランスを表す。例えば積スコア100は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致する場合にのみ得られる。積スコア70は、100%の一致で一端が70%重畳しているか、或いは88%一致で他端が100%重畳しているかの何れかの場合である。積スコア50は、100%の一致で一端が50%重畳しているか、或いは79%の一致で他端が100%重畳しているかの何れかの場合である。

【0264】

或いは、PKINをコードするポリヌクレオチド配列は、由来する組織に対して分析する。例えば、ある完全長の配列は、少なくとも部分的にインサイトcDNA配列をオーバーラップさせて組み立てられる(実施例3を参照)。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、心血管系、結合組織、消化系、胚構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液および免疫系、肺、筋骨格系、神経系、脾臓、呼吸器系、感覚器官、皮膚、顎口腔系、分類不能/混合、または尿管などの1つの生物/組織のカテゴリーに分類される。各カテゴリーにおけるライブラリの数をカウントし、その合計数を全カテゴリーのライブラリ数で除す。同様に、各ヒト組織は、癌、細胞系、発生、炎症、神経、外傷、心血管、プール(pooled)などの1つの疾患/症状のカテゴリーに分類され、各カテゴリーにおけるライブラリの数をカウントし、その合計数を全カテゴリーのライブラリ数で除す。得られるパーセンテージは、

PKINをコードするcDNAの疾患特異的な発現を反映する。cDNA配列およびcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) から得ることができる。

【0265】

8 PKINをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列は、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伸長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の伸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'の伸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伸長した。

【0266】

選択されたヒトcDNAライブラリを用いてこの配列を伸長した。2段階以上の伸長が必要な場合、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。

【0267】

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.)を用いて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200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と-メルカプトエタノールを含むバッファー、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、3、及び4を20回繰り返す
 ステップ6 68 で5分間
 ステップ7 4 で保管

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、3、及び4を20回繰り返す
 ステップ6 68 で5分間
 ステップ7 4 で保管。

【0268】

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伸長することに成功したかを決定する。

【0269】

伸長したヌクレオチドを脱塩及び濃縮してから384ウェルプレートに移し、CviJIコレラウィルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)で消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結する前に音波処理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 B

iolabs, Beverly MA)を用いて伸長したクローンをpUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で制限部位の延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。

【0270】

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、3、及び4を29回繰り返す
- ステップ6 72℃で5分間
- ステップ7 4℃で保管。

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(Applied Biosystems)を用いてシーケンシングした。

【0271】

同様に上述の手順で、完全長のポリヌクレオチド配列を検査したり、或いは完全長のポリヌクレオチド配列を利用して、この伸長のために設計したオリゴヌクレオチドと好適なゲノムライブラリを用いて5'調節配列を得た。

【0272】

9 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用法

SEQ ID NO:13 - 24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、OLIGO4.06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、50pmolの各オリゴマーと、250 μ Ciの[32 P]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) とを組み合わせて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 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。毎分 10^7 カウントの標識されたプローブを含むアリコットを、次のエンドヌクレアーゼ、Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、XbaI 或いはPvu II (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。

【0273】

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、例えば、最大0.1M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の条件の下、プロットを順次室温にて洗浄する。ハイブリダイゼーションパターンをオートラジオグラフィー或いは別のイメージ化手段で視覚化して比較する。

【0274】

1.0 マイクロアレイ

マイクロアレイ上のアレイエレメントの連結または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾプリント (インクジェットプリンター、前出のBalteschweiler等を参照)、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一な非多孔性の固体とするべきである (Schna (1999). 前出)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。別法では、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱や紫外線、または化学的或いは機械的な結合手段で基板の表面にエレメントを配置して結

合させることができる。通常のアレイは利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正な数のエレメントを含めることができる (Schena, M. 他 (1995) *Science* 270:467-470、Shalon, D. 他 (1996) *Genome Res.* 6:639-645、Marshall, A. and J. Hodgson (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:27-31.を参照)。

【0275】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片 (EST)、或いはそれらの断片やオリゴマーが、マイクロアレイのエレメントとなり得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片やオリゴマーを、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可能である。このアレイエレメントを、生体サンプル中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる。生体サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識またはその他の分子タグに結合する。ハイブリダイゼーションの後、生体サンプルからハイブリダイズしなかったヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントにおけるハイブリダイゼーションを検出する。別法では、レーザー脱離及び質量スペクトロメトリーを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上のエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの相補性の程度及び相対的存在量は、算定することができる。一実施例におけるマイクロアレイの調整及び使用について、以下に詳述する。

【0276】

組織または細胞サンプルの調製

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)⁺RNAを精製する。各ポリ(A)⁺RNAサンプルは、MMLV逆転写酵素、0.05 pg/ μ lのオリゴ(dT)プライマー (21mer)、1 \times 第1鎖緩衝液、0.03単位/ μ lのRNアーゼインヒビター、500 μ M dATP、500 μ M dGTP、500 μ M dTTP、40 μ M dCTP、40 μ M dCTP-Cy3 (BDS) またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて逆転写する。この逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte) を用いて、200 ngのポリ(A)⁺RNAを含む25 ml容量で行う。特異的なコントロールポリ(A)⁺RNAは、in vitro転写により非コーディング酵母ゲノムDNAから合成する。370 で2時間インキュベートした後

、各反応サンプル（一方はCy3標識、他方はCy5標識）は、2.5 mlの0.5 M 水酸化ナトリウムで処理し、850 で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを変性する。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピナカラム（CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA）を用いて精製する。結合後、2つの反応サンプルを、1 mlのグリコーゲン（1 mg/ml）、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールを用いてエタノール沈殿させる。サンプルは次に、SpeedVAC（Savant Instruments Inc., Holbrook NY）を用いて乾燥して仕上げ、14 μ l 5 \times SSC / 0.2% SDS中で再懸濁する。

【0277】

マイクロアレイの準備

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを作製する。各アレイエレメントは、クローン化cDNA挿入断片を含むベクターを含有する細菌性細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNA挿入断片に隣接するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRによって、1~2 ngの初期量から5 μ gを超える最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL-400（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて精製する。

【0278】

精製したアレイエレメントを、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス（Corning）は、処理中及び処理後に大量の蒸留水での洗浄と、0.1%のSDS及びアセトン中で超音波による洗浄を行う。スライドガラスは、4%フッ化水素酸（VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA）中でエッチングし、蒸留水中で広範囲にわたって洗浄し、95%エタノール中の0.05%アミノプロピルシラン（Sigma）でコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 の天火で硬化させる。

【0279】

米国特許第5,807,522号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。この特許に引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が100 ng/ μ lのアレイエレメントDNA 1 μ lを高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント（open capillary

printing element) に充填する。次にこの装置が、スライド毎に約 5 nl のアレイエレメントサンプルを分注する。

【0280】

マイクロアレイには、STRATALINKER UVクロスリンカー (Stratagene) を用いてUV架橋する。マイクロアレイは、室温において 0.2% 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、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) における 0.2% カゼイン中で 60 で 30 分間マイクロアレイをインキュベートし、その後上述したように 0.2% SDS 及び蒸留水で洗浄することによってブロックする。

【0281】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、5 × SSC、0.2% SDS ハイブリダイゼーション緩衝液に Cy3 及び Cy5 標識した cDNA 合成産物を各 0.2 µg 含む 9 µl のサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合液を、65 で 5 分間加熱し、マイクロアレイ表面上に一定量分注してから 1.8 cm² のカバーガラスで覆う。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チェンバーに移す。チャンバーの角に 140 µl の 5 × SSC を加えて、チャンバー内を湿度 100% に保持する。このアレイを含むチャンバーを、60 で約 6.5 時間インキュベートする。アレイは、第 1 洗浄緩衝液中 (1 × SSC, 0.1% SDS) において 45 で 10 分間、第 2 洗浄緩衝液中 (0.1 × SSC) において 45 で 10 分間それぞれ 3 回洗浄し、その後乾燥させる。

【0282】

検出

レポーター標識されたハイブリダイゼーション複合体は、Cy3 を励起するための 488 nm、及び Cy3 を励起するための 632 nm のスペクトル線を生成し得る 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。20 倍の顕微鏡対物レンズ (Nikon, Inc., Melville NY) を用いて、アレイ上に励起レーザー光を集中させる。このアレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御 X-Y ステージに置き、対物レンズを通してラスタスキャン

する。本実施例で用いた1.8 cm × 1.8 cmのアレイは、20 μmの解像度でスキャンする。

【0283】

2つの異なるスキャンにおいて、混合ガスマルチラインレーザーは2つの蛍光体を連続的に励起する。放射された光は、波長に基づいて2つの蛍光体に対応する2つの光電子増倍管検出器(PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ)に分割される。アレイと光電子増倍管との間に配設された好適なフィルタを用いて信号をフィルタリングする。用いる蛍光体の最大発光は、Cy3では565 nm、Cy5では650 nmである。装置は両方の蛍光体からのスペクトルを同時に記録できるが、レーザー源に好適なフィルタを用いて、蛍光体1つにつき1回スキャンし、各アレイを通常2回スキャンする。

【0284】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるcDNAコントロール種により生成されるシグナル強度を用いて較正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列を含め、その位置におけるシグナルの強度がハイブリダイズする種の重量比1:100,000に相関するようにする。異なる試料(例えば検査細胞及びコントロール細胞を代表する)からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光体で標識し、他と異なって発現する遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズさせる場合には、較正は2つの蛍光体を有する較正するcDNAのサンプルを標識して、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えて行う。

【0285】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル(AID)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いてデジタル化される。デジタル化されたデータは、リニア20色変換を用いてシグナル強度が青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラー範囲にマッピングされるイメージとして表示される。データはまた、定量的に分析される。2つの異なる蛍光体を同時に励起して測定する場合には、各蛍光体の発光スペクトルを用いて、先ずデータは蛍光体間の光学的漏話(重複発光スペクトルに起因する)に対して補正される。

【0286】

グリッドを蛍光シグナルイメージ上に重畳して、各スポットからのシグナルがグリッドの各エレメントに中央に位置するようにする。各エレメント内の蛍光シグナルを統合し、シグナルの平均強度に対応する数値を得る。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEMTOOLS遺伝子発現分析プログラム (Incyte) である。

【0287】

1.1 相補的ポリヌクレオチド

PKIN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、天然のPKINの発現を低下させるため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。Oligo4.06ソフトウェア (National Biosciences) 及びPKINのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、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ディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがPKINをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0288】

1.2 PKINの発現

PKINの発現及び精製は、細菌若しく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PKIN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PKINを発現する。真核細胞でのPKIN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、PKIN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)。

【0289】

殆どの発現系では、PKIN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(Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でPKINからタンパク質的に切断できる。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)を用いた免疫親和性の精製が可能となる。6個の連続するヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)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)に記載されている。これらの方法で精製したPKINを直接用いて以下の実施例16、17、及び18のアッセイを行うことができる。

【0290】

1.3 機能のアッセイ

PKIN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PKIN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 µgの組換えベクターを、例えば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時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1 ~ 2 µg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)、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、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。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、プ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。

【0291】

遺伝子発現におけるPKINの影響は、PKIN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か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、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。PKIN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。

【0292】

1.4 PKINに特異的な抗体の作製

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. 1816 - 3088-495を参照)または他の精製技術で実質的に精製されたPKINを用いて、標準的なプロトコルでウサギを免疫化して抗体を作り出す。

。

【0293】

別法では、PKINアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)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生産する。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, 1995, 11章を参照)。

【0294】

通常、約15残基の長さのオリゴペプチドを、Applied BiosystemsのABI 431Aペプチドシンセサイザー(PE Biosystems)を用いてfmoc法のケミストリにより合成し、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-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫原性を高める(例えば、前出のAusubel, 1995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PKIN活性を検査するには、ペプチドまたはPKINを基板に結合し、1%BSAを用いてブロッキング処理し、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。

【0295】

1.5 特異的な抗体を用いる天然PKINの精製

天然PKIN或いは組換えPKINを、PKINに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSE(Amersham Pharmacia Biotech)のような活性化クロマ

トグラフィー用レジンと抗PKIN抗体とを共有結合させることにより形成する。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キング処理し洗浄する。

【0296】

PKINを含む培養液をイムノアフィニティーカラムに通し、PKINを優先的に吸着できる条件で（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）そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とPKINとの結合を切るような条件で（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、PKINを回収する。

【0297】

1.6 PKINと相互作用する分子の同定

PKINまた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 A.E.及びW.M. Hunter (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PKINと共にインキュベートし、洗浄して、標識したPKIN複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なPKIN濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したPKINの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【0298】

別法では、PKINと相互作用する分子を、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 (yeast two-hybrid system) や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分析する。

【0299】

PKINはまた、ハイスループット型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス (CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、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) 米国特許第6,057,101号)。

【0300】

1.7 PKINの活性の実証

通常は、プロテインキナーゼ活性は、標識した ^{32}P -ATPの存在下でのPKINによるタンパク質基質のリン酸化を定量して測定する。PKINを、基質タンパク質、 ^{32}P -ATP、および好適なキナーゼバッファーでインキュベートする。基質に組み込まれた ^{32}P を遊離 ^{32}P -ATPから電気泳動法により分離して、組み込まれた ^{32}P をラジオアイソトープカウンタでカウントする。組み込まれた ^{32}P の量がPKIN活性に比例する。リン酸化された特定のアミノ酸残基を、加水分解したタンパク質のホスホアミノ酸分析で決定する。

【0301】

別法では、プロテインキナーゼ活性は、アデノシン三リン酸(ATP)から基質タンパク質のセリン、トレオニン、またはチロシン残基へのリン酸の移動を定量して測定する。反応は、ビオチン標識した基質ペプチドを含むプロテインキナーゼサンプルと ^{32}P -ATPとの間で生じる。反応の後、溶液中に遊離しているアビジンを、ビオチン標識した ^{32}P ペプチド生成物と結合するように加える。次に、生成物とアビジンとの複合体を保持する一方で遊離 ^{32}P -ATPを通過させる膜で、結合したサンプルを遠心分離限外濾過する。残留物として ^{32}P ペプチド生成物を含む遠心分離して貯まったものをシンチレーションカウンタでカウントする。この方法は、基質ペプチドおよびキナーゼ反応バッファーを変更すれば、あらゆる種類のプロテインキナーゼサンプルをアッセイすることができる(ASUA, Affinity Ultrafiltration Separation Assay, Transbio Corporation, Baltimore MD, U. S. Patent No. 5, 869, 275)。好ましい基質およびそれらに対応する酵素には、Histone H1 (Sigma) およびp34^{cdc2}キナーゼ、Annexin I、Angiotensin (Sigma)およびEGF受容体キナーゼ、Annexin II およびsrcキナーゼ、ERK1 & ERK2 基質およびMEK、およびミエリンを基にしたタンパク質およびERK (Pearson, J. D. ら (1991) Methods in Enzymology 200 : 62-81)。

【0302】

更なる別法では、PKINのプロテインキナーゼ活性は、PKIN、50 μl のキナーゼバッファー、ミエリンを基にしたタンパク質(MBP)や合成ペプチド基質などの1 μg の基質、1 mM DTT、10 μg ATP、および0.5 μCi [^{32}P] ATPを含むin vitroのアッセイで実証する。反応液を30 $^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートし、ピペット

でP81ペーパーに移して反応を停止させる。洗浄して組み込まれなかった[$-^{32}\text{P}$] ATPを除去し、組み込まれた放射能を放射能シンチレーションカウンタで測定する。別法では、SDSローディングバッファの存在下で100℃に加熱して反応を停止し、オートラジオグラフにより12%SDSポリアクリルアミドゲル上で視覚化する。組み込まれた放射能を、PKINの不在下或いは不活性なキナーゼK38Aの存在下で行った反応に対して補正する。

【0303】

更なる別法では、アデニルサンキナーゼ活性またはグアニル酸キナーゼ活性は、 ^{32}P 標識した ^{32}P -ATPからADPまたはGDPへの ^{32}P の組み込みをラジオアイソトープカウンタで測定することができる。キナーゼバッファ中の酵素を好適なヌクレオチド1リン酸基質（AMPまたはGMP）およびリン酸供与体としての ^{32}P 標識ATPと共にインキュベートする。反応液を37℃でインキュベートし、トリクロロ酢酸を加えて反応を停止する。酸性抽出物を中和し、ゲル電気泳動法でモノホスホヌクレオチド、ジホスホヌクレオチド、およびトリホスホヌクレオチド（mono-phosphonucleotide、di-phosphonucleotide、triphosphonucleotide）の断片に分離する。ジホスホヌクレオチド断片を分離してカウントする。回復した放射活性が酵素活性に比例する。

【0304】

更なる別法では、PKINの他のアッセイに、シンチレーション近接アッセイ（SPA: scintillation proximity assay）、シンチレーションプレート技術、およびフィルタ結合アッセイが含まれる。有用な基質には、グルタチオントランスフェラーゼ標識組換えタンパク質、ビオチン標識合成ペプチド基質がある。小さな有機分子や、タンパク質即ちペプチドなどのPKIN活性のインヒビターが、このようなアッセイで同定できる。

【0305】

1.8 プロテインキナーゼ活性の増強/抑制

PKIN活性化アゴニストまたはPKIN不活化アンタゴニストは、実施例17に記載したアッセイで検査することができる。アゴニストはPKIN活性を上昇させ、アンタゴニストはPKIN活性を低下させる。

【0306】

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。特定の好適な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例の様々な改変は、特許請求の範囲に含まれる。

【0307】

(表の簡単な説明)

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列に対する系統的な名称を示す。

【0308】

表2は、本発明の各ポリペプチドに最も近いGenBankの相同体のGenBankの識別番号およびアノテーションを示す。各ポリペプチドとそのGenBankの相同体との間の一致を表す確率値スコアも示す。

【0309】

表3は、推定上のモチーフおよびドメインを含む各ポリペプチド配列の構造的な特徴、並びに各ポリペプチドの分析に用いた方法、アルゴリズム、および検索可能なデータベースを示す。

【0310】

表4は、各ポリヌクレオチド配列の組み立てに用いたcDNA断片およびゲノムDNA断片のリスト、並びにポリヌクレオチド配列の選択された断片のリストを示す。

【0311】

表5は、本発明の各ポリヌクレオチドの代表的なcDNAライブラリを示す。

【0312】

表6は、表5に示すcDNAライブラリの作製に用いた組織およびベクターを示す付録である。

【0313】

表7は、本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、及びアルゴリズム、並びにその説明、引用文献、閾値パラメータを示す。

【表1】

表1

インサイトプロジェクトID	ポリペプチド SEQ. ID. NO.	インサイト ポリペプチドID	ポリヌクレオチド SEQ. ID. NO.	インサイト ポリヌクレオチドID
058860	1	058860CD1	13	058860CB1
2041716	2	2041716CD1	14	2041716CB1
7472005	3	7472005CD1	15	7472005CB1
7472006	4	7472006CD1	16	7472006CB1
2902460	5	2902460CD1	17	2902460CB1
6383934	6	6383934CD1	18	6383934CB1
3210906	7	3210906CD1	19	3210906CB1
3339024	8	3339024CD1	20	3339024CB1
4436929	9	4436929CD1	21	4436929CB1
5046791	10	5046791CD1	22	5046791CB1
1416174	11	1416174CD1	23	1416174CB1
3244919	12	3244919CD1	24	3244919CB1

表2

ポリペプチド SEQ ID NO	インサイト ポリペプチドID	GenBank ID NO	確率スコア	GenBank 相同体
1	058860CD1	g2677788	8.6e-50	不明 [ムナシノブダイ], g4322024と関係あり。 ミオシン7鎖キナーゼアイソフォーム3B
2	2041716CD1	g1836161	8.3e-253	Ca2+/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼIV キナーゼアイソフォーム [クマネズミ]
3	7472005CD1	g1750259	0.0	Eph-及びEtk-関連キナーゼ [ハツカネズミ]
4	7472006CD1	g404634	3.6e-163	セリン/トレオニンキナーゼ [ハツカネズミ]
5	2902460CD1	g396429	4.9e-264	IP3-キナーゼ [ドブネズミ]
6	6383334CD1	g2738898	5.2e-173	タンパク質キナーゼ [ハツカネズミ]
7	3210906CD1	g5616074	0.0	前立腺誘導剤E20-様キナーゼPSK [ヒト]
8	3339024CD1	g5295850	4.4e-123	QA79様タンパク質 [ヒト] (Falco, M. 他 (1999) J. Exp. Med. 190:793-802)
9	4436929CD1	g1872546	0.0	NIK(Nck相対作用キナーゼ) [ハツカネズミ] (Su, Y. C. 他 (1997) EMBO J. 16:1279-1290)
10	5046791CD1	g861314	2.7e-21	Ser/Thrタンパク質キナーゼ類似 [緑虫]
11	1416174CD1	g8248287	2.00E-61	スフィンゴシンキナーゼ型2アイソフォーム [ハツカネズミ]
12	3244919CD1	g7161864	3.10E-185	セリン/トレオニンタンパク質キナーゼ [ハツカネズミ]

【表3】

表3-1

SEQ ID NO.	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
1	058860CD1	466	T422 T5 T12 S19 T31 S46 S83 S168 S179 T194 T331 S351 S365 T422 T52 S163 T299 T312 S402 T451 Y446	N59 N81 N361 N452	受容体チロシンキナーゼ: F395-G418 チオールプロテアーゼHisモチーフ: M116-A126	MOTIFS BLIMPS- BLOCKS
2	2041716CD1	513	S74 T108 S466 T26 S74 S82 S117 S427 S433 T438 T58 S69 S100 S169 S338 S445	N156	ATP/GTP結合部位モチーフA (Pループ): G493-S500 セリン/トレオニンタンパク質キナーゼ 活性部位シグネチャ: L279-L291 真核性タンパク質キナーゼドメイン: Q146-V417 チロシンキナーゼ補葉ドメイン: Y273-L291, G320-I330, L342-D364 キナーゼタンパク質B: M1-Q127 タンパク質キナーゼドメイン: L130-V408	MOTIFS BLAST-DOMO HAMMER-EFAM BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM

表3-2

SEQ ID NO.	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 クロニコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列, トメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
3	7472005CD1	1012	S56 T104 T117 S129 S136 T155 T219 S225 S374 S577 T615 T805 S817 T843 S856 S857 S897 S926 T941 S177 S196 T242 T489 T494 T531 T674 S848 S908 S948 T997 Y487 Y610 Y756	N340 N407 N432 N718 N841	真核性タンパク質キナーゼドメイン: 1635-V306 タンパク質キナーゼATP-結合領域 シグネチャ: 1641-K667 チロシンタンパク質キナーゼ特異 活性部位シグネチャ: Y756-V768 受容体チロシンキナーゼクラスV: E247-E267 (シグネチャ) E31-H52, D61-P112, K165-V218 R243-E267, C273-F320, Y335-Y365, G376-S419, S455-K480, G501-I531, P605-G644, P657-W710, L721-W740, L741-A762, A763-P789, G797-W829, E830-Y854, F958-Q1001, L34-G380 チロシンキナーゼ触媒ドメイン シグネチャ: I713-R726, Y750-V768, I800-I810, S819-N841, G870-F892 キナーゼ受容体プレカサ: E31-G204 エフリン受容体リガンド結合ドメイン: E31-G204	MOTIFS HMMER-PFAM BLIMPS- BLOCKS BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM BLAST-DMO
					シグナルペプチド: M1-G30 膜貫通領域: V554-L561	SPScan HMMER HMMER

【表5】

表3-3

SEQ ID NO.	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列、ドメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
4	7472006CD1	367	T310 T326 S349 S31 S158 S166 S290 S304		タンパク質キナーゼATP-結合領域シグネチャ: L18-K41 セリン/トレオニンタンパク質キナーゼ 活性部位シグネチャ: V132-L144 真核性タンパク質キナーゼドメイン: Y12-N272 精製精製セリン/トレオニンキナーゼ: R272-T384 タンパク質キナーゼドメイン: L14-I263 チロシンキナーゼ触媒ドメイン シグネチャ: M90-K103, Y126-L144, Y197-S219	MOTIFS HMMR-PFAM BLAST- PRODOM BLAST-DMO BLIMPS- PRINTS
5	2902460CD1	798	S56 S65 T67 T96 S98 T123 S132 S451 S428 S462 S463 Y464 S467 S473 T602 Y603 T634 T715 S18 S69 S116 S179 S292 S324 S386 S440 S499 S515 S531 S616	N317	シグナルペプチド: M1-A24 カルモジュリン結合ドメイン: DM07435 (P42335) 210-672: P332-L787 プロリンに富むタンパク質: DM01369 (B39066) 172-256: G274-P330 1-Dミオインシトルトリス-ホスファート3 キナーゼ EG 2, 7, 127, イノシトール 1, 4, 5-トリスホスファート, IP3K, IP3, トランスフェラーゼ, キナーゼ, カルモジュリン結合: PDI38098: G120-S510	SPScan MOTIFS BLAST- PRODOM BLAST-DMO

表3-4

SEQ ID NO.	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
6	6383934CDI	358	Y293 T48 S349 S31 S158 S258 S284 T340		タンパク質キナーゼAIP結合ドメイン: L18-K41 タンパク質キナーゼST: I132-L144 チロシンキナーゼ触媒ドメイン シグネチャ: M90-K103, Y126-L144, Y197-S219 真核性タンパク質キナーゼドメイン: Y12-L272 タンパク質キナーゼドメイン: DM00004 (I48609) 55-294; L18-R260 精巢特異シリン/トオニンキナーゼ 2タンパク質キナーゼ P0029090; L272-I358 タンパク質キナーゼドメイン: DM00004 (JG1446) 20-261; V14-I263	MOTIFS PFAM BLIMPS- PRINTS
7	3210906CDI	1049	S306 S9 S111 T214 T346 S370 S375 T671 T701 S806 S853 S894 S1014 S60 S62 S453 T468 S521 T586 T604 T671 S742 T757 T776 T793 T886 S889 S910 T990 Y309	N1042	タンパク質キナーゼドメイン: DM00004 (P46549) 32-279; D30-R269 タンパク質キナーゼST: M147-L168 真核性タンパク質キナーゼドメイン: F28-Y281 タンパク質キナーゼシグネチャ及び プロファイル: E127-N180 セリン/トレオニンタンパク質キナーゼ TA01: E618-P777	BLAST-DOMO MOTIFS HMMER-PFAM PROFILES SCAN
8	3339024CDI	322	S42 S117 T246 S266 S284 T109 T172 T195 S231 S236	N17 N87 N94 N112		BLAST- PRODOM MOTIFS

冊3-5

SEQ ID NO.	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列, ドメイン及びモチーフ	分析方法及び データベース
9	4436929CD1	1212	S77 T187 S259 S608 S873 S9 S17 T59 S112 T124 T222 S264 T319 S324 S326 S548 S567 S604 S627 S680 S739 S740 T746 T747 S764 S778 T989 S1016 S1036 T1050 S1076 S255 S259 T309 T351 T557 T597 S604 S679 S687 S784 T869 S956 S1089 S1190 Y321 Y323 Y467	N33 N546 N624 N776 N1144	真核性タンパク質キナーゼドメイン: F25-L289 タンパク質キナーゼドメイン: DM00004(P10676)18-272-L27-P278 GNHドメイン: Y894-R1192 タンパク質キナーゼシグネチャ及び プロドメイン: W129-W181 タンパク質キナーゼST: V149-L161 NIK(Nck相互作用キナーゼ): PD147187: D496-W908	HMMER-PFAM BLAST-DOMO HMMER-PFAM PROFILES SCAN MOTIFS BLAST- PRODOM
10	5046791CD1	280	S102 T161 Y162 T92 S209 S243 S102 T161	NI55	タンパク質F55A11.6 C52E4.7, Ser/Ihrキナーゼ類似: PD024191: G11-L130	BLAST- PRODOM
11	1416174CD1	114			タンパク質染色体 C3468.5 C448.07C I スフィンゴシンXII コスミド OMF: PD014044: H8-P97	BLAST- PRODOM
12	3244919CD1	375	S92 S276 T9 T48 T125 S295 T360 Y52	N338	タンパク質キナーゼATP結合ドメイン: I145-L157 タンパク質キナーゼST: I145-L157 真核性タンパク質キナーゼドメイン: F26-6278 チロシンキナーゼ触媒ドメイン: PRO0109: V103-Q116, Y139-L157 タンパク質キナーゼドメイン: DM00004(P51644)122-382-L28-S275 DM08046(P05886)1-397-S3-P305	MOTIFS MOTIFS HMMER-PFAM BLIMPS- PRINTS BLAST-DOMO

【表8】

表4-1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO	インサイト ポリヌクレオチドID	配列長さ	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
13	058860CB1	1859	1-837, 1111-1198	60122573D4 058860F6 (MUSCNOT01) 3011528F6 (MUSCNOT07) 3016678T6 (MUSCNOT07) 3500745F6 (PROSTUT13) g4454511.v113.gs_3.nt.edit 6063491H1 (BRAENOT02) 2190612F6 (THVRTUT03) 70168906V1 70164503V1 70168645V1 70167500V1 1383374T6 (BRAITUT08) 543319R6 (OVARNOT02) g5679461.v113.gs_2.edit	1 370 852 1299 1 22 715 1093 1072 1392 1840 2056 2541 2688 2943 1	491 1005 1341 1859 456 884 1093 1658 1989 2664 2696 3123 3255 3501 3039
14	2041716CB1	3501	1-2773			
15	7472005CB1	3039	1-557, 2741- 3039, 824-1827			
16	7472006CB1	1104	823-1104	g5686590.v113.gs_5	1	1104
17	2902460CB1	3939	1-1642, 2515-3100, 3766-3939	70166919V1 6882904J1 (BRAHTDR03) 7117043H1 (BRAHNOE01) 7090661H1 (BRAUTDR03) 6811472J1 (SKIRNOR01) 6882520J1 (BRAHFDRO3) 3753286H1 (BRAHDT04) 7029494H1 (BRAXTDR12) 6911565J1 (FITUDIR01) 7176637H1 (BRSTTNC01) 2695922F6 (UTRNSNOT12) g3873504.v113.gs_3.nc 2011686H1 (TESTN0T03) g2821547 6383934H1 (FIBRUNT02) 5281219H1 (TESTNON04)	3381 1399 614 914 2436 1 3939 1692 2169 2766 3114 73 665 972 874 1	3916 2005 1253 1492 3034 639 3939 2288 2757 3358 3571 1149 858 1381 1176 239
18	6383934CB1	1381	1-359			

【表9】

表4-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO	インサイト ポリヌクレオチドID	配列長さ	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
19	3210906CB1	3904	3815-3904, 1-449 901-1443, 1486-1805, 3039-3432	533823R6 (BRAINT03) 1807122F6 (SINNOT13) 4785178H1 (BRAINT03) 1439938F6 (THYNOT03) 2654018H1 (THYNOT04) 713861X11 (PROSTUT01) 1416996X10D1 (BRAINT02) 4326355F6 (TYMUNT01) 2512189F6 (CONUTUT01) 273994R6 (FANCDIT03) 860975R6 (BRAINT03) 273994F6 (FANCDIT03) 70774378V1 70772051V1 3339024F6 (SPLNNOT10) 70775014V1 2986160H1 (CARGDIT01) 1852144T6 (LUNGFET03) 3136101F6 (SMCNOT01) SCLA03429V1 G3327187 CD 2606210F6 (LUNGTUT07) 2827761F6 (TYMNOT03) SZAU00120V1 3085382H1 (HEAONOT03) 2956512H1 (KIDNFET01) SCLA04243V1 1741505R6 (HIPONON01) 2805893F6 (BLADTUT08) 6390331H1 (EONENOT01) G1512902 260140R6 (HNT2PAT01) 70495437V1	3136 3432 2594 267 1336 1 2383 959 1593 666 2717 1947 446 787 1465 1 629 1395 1987 1299 1588 3362 3925 555 1107 2886 3425 251 3925 2654 3136 633 1149 1 575 1427 1723 3430 2865 2312 1919 2435 1085 1544 1 262 637 1210 586 1200 213 880	
20	3339024CB1	1987	1-125, 1955-1987, 1461-1493			
21	4436929CB1	3925	1431-2791, 1-956			
22	5046791CB1	1210	1-244			

【表10】

表4-3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO	インサイト ポリヌクレオチドID	配列長さ	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
23	1416174CB1	1521	1-792 876-975	3869131HI (EMARNO03)	1	231
				1416174HI (BRAINO12)	155	402
				2169725T6 (EMDCNO03)	933	1504
				168338F6 (PROSNO15)	1030	1521
				1284949T6 (COLANNO16)	871	1489
				3272203F6 (BRAINO20)	269	898
24	3244919CB1	1640	919-1535	2287966H1 (BRAINO01)	1429	1640
				6307341HI (NERDNO03)	440	1134
				7177378HI (BRAXICO1)	1	526
				7057034IV1	1201	1588
				5372702H1 (BRAINO22)	1428	1633
				70568614V1	677	1336

表5

ポリスクレオチドSEQ ID NO	インサイト プロジェクトID	代表的ライブラリ
13	058860CB1	MSCNOT07
14	2041716CB1	BRAXNOT03
17	2902460CB1	BRAGNOT02
18	6383934CB1	FIBRUNT02
19	3210906CB1	BRAITUT03
20	3339024CB1	THYRNOT08
21	4436929CB1	ENDCNOT03
22	5046791CB1	BRAEDIR01
23	1416174CB1	CARGDIT01
24	3244919CB1	BRAINOT21

表 6-1

【表 13】

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
MUSCNOT07	pINCY	ライブラリは、年齢 38 歳の白人女性の前腕から軟組織切除の際に採取された筋肉組織から単離された 2 マイクログラムのポリ A RNA を用いて作製した。病理学的には、再切除の際に腫瘍のない外科的余地を示していた。関連腫瘍組織の病変は、筋肉内血管腫を示していた。患者の病歴は、正常分娩を含む。患者の投薬には、メラトニン、バリウム、及びタイラノール PM を含む。家族歴には、母親の乳癌、祖母に良性高血圧症、脳血管障害、結腸癌、及び II 型糖尿病があった。
BRAXNOT03	pINCY	ライブラリは、心不全で死亡した 35 歳の白人男性の脳から採取した感覚運動皮質組織から単離した 1.5 マイクログラムのポリ A RNA を用いて作製した。病理学的には、中程度の軟膜線維症及び大脳新皮質の複数の微小梗塞を示していた。大まかに脳の領域は検査され、脳神経は注意を引かず、萎縮の証拠はなかった。主要な血管ではアテローム性動脈硬化症は見られなかった。微視的には、大脳半球は、限局性石灰化を伴う中程度の軟膜線維症を示していた。萎縮した僅かに好酸球性の錐体ニューロンの証拠が大脳半球全体にあった。グリオシスを伴うキャピテーションの複数の微視的領域も大脳皮質全域に分散していた。ピールシヨースキー銀染色、クリューバー・ハレラ染色、及びコンゴ赤染色による特殊な染色では予想される神経原線維変化若しくは広汎食欲減退アミロイドプラーク、髄鞘脱落、及び大脳アミロイド血管障害の証拠は発現しなかった。患者の病歴には、拡張型心筋症、うっ血性心不全、心臓肥大、脾腫及び肝肥大が含まれる。患者には、Simethicone, Lasix, Digoxin, Colace, Zantac, Captopril 及び Vasotec を投薬した。

表6-2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BRAGN002	pINCY	ライブラリは、標準化された黒質組織ライブラリからの独立したクローン4.2×10 ⁷ 個から作製した。開始 RNA は、アテローム性動脈硬化症による胸部大動脈破裂及び出血で死亡した81歳の白人女性から採取した黒質組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、両側の内頸動脈含む中程度のアテローム性動脈硬化症；前頭皮質と海馬の顕微鏡的梗塞；及び年齢相応の広汎アミロイドブラークの散乱と神経原線維濃縮を示した。軟髄膜の大部分は軽度な肥厚と矢状静脈洞上部沿いのヒアリン化だけを示した。軟髄膜の残りの部分は薄く、鬱血した血管を含んでいた。軽度の萎縮が主に大脳前頭極と前頭葉及び高側頭葉に見られた。微視的には、新皮質の深層内に一組のアルツハイマーII型星状細胞があった。前頭皮質中央及び神経原線維濃縮体を含んでいた。後海馬は、反応性グリオシスで囲まれたヘモジテリンを有するマクロファージを伴う蠟胞性キャビテーションの微細的領域を含んでいた。患者の病歴には、敗血症、胆管炎、術後のアテレクトターゼ、肺炎 CAD、左心室肥大による心臓肥大、脾腫、細動脈性腎硬化症、結節性コロイド状甲状腺腫、肺気腫、CHF、甲状腺機能低下、及び末梢血管疾患が含まれる。ライブラリは、著しく長い(48時間/回)アニーリングハイブリダイゼーションが用いられたの以外には Soares 他、PNAS(1994) 91:9928-9232 及び Bonaudo 他、Genome Research 6 (1996):791 の条件に従って2回標準化した。
FIBRUNT02	pINCY	ライブラリは、14歳の白人男性から採取した骨肉腫から派生された未処置の MG-63 細胞株から単離したポリ A RNA を用いて作製した。
BRABD1R01	pINCY	ライブラリは、脳血管塞作で死亡した57歳白人男性の脳から採取した病変脳血管組織から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴には、ハンチントン病、気腫、長期にわたる喫煙があった。
BRAITUT03	PSPORT1	ライブラリは、17歳の白人男性の脳腫瘍病巣の切除の際に左前葉から採取した脳腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、グレード4の繊維状の巨細胞及び小細胞星状細胞腫を示していた。家族歴には、良性高血圧症及び脳血管障害が含まれていた。
EMDCNGT03	pINCY	ライブラリは、ある白人新生児(男児)から採取した皮膚微小血管内皮細胞から単離した RNA を用いて作製した。

【表14】

【表 15】

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
THYRN0T08	pINCY	ライブラリは、13歳の白人女性から完全甲状腺切除の際に採取した左甲状腺組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、リンパ球性甲状腺炎を示していた。関連腫瘍組織の病変は、グレード 1 の乳頭状の癌腫を示した。首の右、左及び正中部分の複数のリンパ節は腫瘍に対して陰性である。胸腺の断片は良性であった。線維脂肪の組織が右下部及び上部の副甲状腺領域に認められた。首の右側からの複数のリンパ節(6のうち 2)は、転移性の乳頭状癌腫の顕微鏡的病巣を含んでいる。患者の病歴は、機能亢進を伴う注意欠陥障害を含む。過去の外科手術は外耳手術を含む。患者への投薬は、Prozac を含む。家族歴は、母親の慢性的閉塞性喘息、祖父母のアルコール中毒、良性高血圧、及び抑うつ障害、兄弟の機能亢進を伴う注意欠陥障害が含まれる。
BRAIN0T21	pINCY	ライブラリは、46歳の白人男性からロベクトミーの際に左前頭葉から採取した病変脳組織から単離した RNA を用いて作製した。病理学的には、普の重度頭部外傷に一致する、顕著なグリオオシスおよびモジデリン沈着を含む、空洞化および広範な反応の変化によって特徴付けられる左前頭葉における皮質および副腎皮質の局所的な瘢痕を示していた。星状細胞において GFAP 陽性であった。反応パターンは、反応性グリオオシスの反応パターンであった。既往症には、外傷性頭蓋内出血、頭部外傷後の意識喪失を伴った脳外傷があった。家族歴には、脳血管疾患、およびアテローム硬化性冠状動脈疾患があった。
CARDI0T01	pINCY	ライブラリは、病変軟骨組織から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴は、変形性関節症を含む。

表7-1

プログラム名	説明	引用文献	パラメータ-閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して不定の塩基をマスクするプログラム。	Applied 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付け (annotation) に有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラム。	Applied 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つのファンクションがある。	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、問合わせの配列と同種の配列群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つのファンクションを含む。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 構築された 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、BLOCKS 及び PRINTS、DOMO、PRODOM、PFAM データベースにおける配列に対して、ある配列の一致性を調べ、遺伝子ファミリー及び配列相同性、構造的フィングアープリント領域を探索する。	Henikoff, S and J.G. Henikoff, Nucl. Acid Res., 19:6565-72, 1991. J.Ci. Henikoff and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, J.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37: 417-424.	確率値=1.0E-3 以下
FIMMER	PFAM などのタンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベースに対して問合せ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM ヒット : 確率値=1.0E-3 以下 シグナルペプチドヒット:スコア=0 以上

【表 16】

表7-2

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及び配列のモチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	標準化された質のスコア≧特定の Prositeモチーフに対するCGC指定 "HIGH" 値 通常、スコア=1.4-2.1
Phred	高い感度及び雑音で自動配列決定機のアナログ出力を調べる塩基誤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インプリメンテーションに基づく SWAT や CrossMatch を含む Phils Revised Assembly プログラムであって、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. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. and 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 で構築したものの表示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キャンして分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み付けマトリクス解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=3.5 以上
TMAP	蛋白配列での疎質通セグメントの描写及び配向の決定のための、加重マトリクスを用いたプログラムである。	Persson, B. and P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	蛋白配列での疎質通セグメントの描写及び配向の決定のための、隠された Markov モデル(HMM)を用いたプログラムである。	Sonnhammer, E. L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow et 他, es., The Am. Assoc. for Artificial intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	Prosite で定義された配列と一致したパターンについてアミノ酸配列を検索するプログラムである。	Bairoch 他, (1997) Nucleic Acid Res. 25: 217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

【配列表】

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 YANG, Junming
 BAUGHN, Mariah R.
 BURFORD, Neil
 AU-YOUNG, Janice
 LU, Dyung Aina M.
 REDDY, Roopa
 YUE, Henry
 YAO, Monique G.
 LAL, Preeti
 KAHN, Farrah A.

<120> HUMAN KINASES

<130> PI-0002 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/172,066; 60/176,107; 60/176,107; 60/177,731
 <151> 1999-12-23; 2000-01-14; 2000-01-14; 2000-01-21

<160> 24
 <170> PERL Program

<210> 1
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 058860CD1

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

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

<210> 2
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2041716CD1

<400> 2
 Met Glu Gly Gly Pro Ala Val Cys Cys Gln Asp Pro Arg Ala Glu
 1 5 10 15
 Leu Val Glu Arg Val Ala Ala Ile Asp Val Thr His Leu Glu Glu
 20 25 30
 Ala Asp Gly Gly Pro Glu Pro Thr Arg Asn Gly Val Asp Pro Pro
 35 40 45
 Pro Arg Ala Arg Ala Ala Ser Val Ile Pro Gly Ser Thr Ser Arg
 50 55 60
 Leu Leu Pro Ala Arg Pro Ser Leu Ser Ala Arg Lys Leu Ser Leu
 65 70 75
 Gln Glu Arg Pro Ala Gly Ser Tyr Leu Glu Ala Gln Ala Gly Pro
 80 85 90
 Tyr Ala Thr Gly Pro Ala Ser His Ile Ser Pro Arg Ala Trp Arg
 95 100 105
 Arg Pro Thr Ile Glu Ser His His Val Ala Ile Ser Asp Ala Glu
 110 115 120
 Asp Cys Val Gln Leu Asn Gln Tyr Lys Leu Gln Ser Glu Ile Gly
 125 130 135
 Lys Val Gly Leu Thr Asp Ala Tyr Leu Gln Gly Ala Tyr Gly Val
 140 145 150
 Val Arg Leu Ala Tyr Asn Glu Ser Glu Asp Arg His Tyr Ala Met
 155 160 165
 Lys Val Leu Ser Lys Lys Lys Leu Leu Lys Gln Tyr Gly Phe Pro
 170 175 180

Arg Arg Pro Pro Pro Arg Gly Ser Gln Ala Ala Gln Gly Gly Pro
 185 190 195
 Ala Lys Gln Leu Leu Pro Leu Glu Arg Val Tyr Gln Glu Ile Ala
 200 205 210
 Ile Leu Lys Lys Leu Asp His Val Asn Val Val Lys Leu Ile Glu
 215 220 225
 Val Leu Asp Asp Pro Ala Glu Asp Asn Leu Tyr Leu Val Asp Leu
 230 235 240
 Leu Arg Lys Gly Pro Val Met Glu Val Pro Cys Asp Lys Pro Phe
 245 250 255
 Ser Glu Glu Gln Ala Arg Leu Tyr Leu Arg Asp Val Ile Leu Gly
 260 265 270
 Leu Glu Tyr Leu His Cys Gln Lys Ile Val His Arg Asp Ile Lys
 275 280 285
 Pro Ser Asn Leu Leu Leu Gly Asp Asp Gly His Val Lys Ile Ala
 290 295 300
 Asp Phe Gly Val Ser Asn Gln Phe Glu Gly Asn Asp Ala Gln Leu
 305 310 315
 Ser Ser Thr Ala Gly Thr Pro Ala Phe Met Ala Pro Glu Ala Ile
 320 325 330
 Ser Asp Ser Gly Gln Ser Phe Ser Gly Lys Ala Leu Asp Val Trp
 335 340 345
 Ala Thr Gly Val Thr Leu Tyr Cys Phe Val Tyr Gly Lys Cys Pro
 350 355 360
 Phe Ile Asp Asp Phe Ile Leu Ala Leu His Arg Lys Ile Lys Asn
 365 370 375
 Glu Pro Val Val Phe Pro Glu Glu Pro Glu Ile Ser Glu Glu Leu
 380 385 390
 Lys Asp Leu Ile Leu Lys Met Leu Asp Lys Asn Pro Glu Thr Arg
 395 400 405
 Ile Gly Val Pro Asp Ile Lys Leu His Pro Trp Val Thr Lys Asn
 410 415 420
 Gly Glu Glu Pro Leu Pro Ser Glu Glu Glu His Cys Ser Val Val
 425 430 435
 Glu Val Thr Glu Glu Glu Val Lys Asn Ser Val Arg Leu Ile Pro
 440 445 450
 Ser Trp Thr Thr Val Ile Leu Val Lys Ser Met Leu Arg Lys Arg
 455 460 465
 Ser Phe Gly Asn Pro Phe Glu Pro Gln Ala Arg Arg Glu Glu Arg
 470 475 480
 Ser Met Ser Ala Pro Gly Asn Leu Leu Val Lys Glu Gly Phe Gly
 485 490 495
 Glu Gly Gly Lys Ser Pro Glu Leu Pro Gly Val Gln Glu Asp Glu
 500 505 510
 Ala Ala Ser

<210> 3
 <211> 1012
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7472005CD1

<400> 3
 Met Ala Pro Ala Arg Gly Arg Leu Pro Pro Ala Leu Trp Val Val
 1 5 10 15
 Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Cys Val Ser Ala Ala Arg Gly
 20 25 30
 Glu Val Asn Leu Leu Asp Thr Ser Thr Ile His Gly Asp Trp Gly
 35 40 45
 Trp Leu Thr Tyr Pro Ala His Gly Trp Asp Ser Ile Asn Glu Val
 50 55 60
 Asp Glu Ser Phe Gln Pro Ile His Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val
 65 70 75

Met	Ser	Pro	Asn	Gln	Asn	Asn	Trp	Leu	Arg	Thr	Ser	Trp	Val	Pro
				80					85					90
Arg	Asp	Gly	Ala	Arg	Arg	Val	Tyr	Ala	Glu	Ile	Lys	Phe	Thr	Leu
				95					100					105
Arg	Asp	Cys	Asn	Ser	Met	Pro	Gly	Val	Leu	Gly	Thr	Cys	Lys	Glu
				110					115					120
Thr	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Glu	Ser	Asp	Arg	Asp	Leu	Gly	Ala
				125					130					135
Ser	Thr	Gln	Glu	Ser	Gln	Phe	Leu	Lys	Ile	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala
				140					145					150
Asp	Glu	Ser	Phe	Thr	Gly	Ala	Asp	Leu	Gly	Val	Arg	Arg	Leu	Lys
				155					160					165
Leu	Asn	Thr	Glu	Val	Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ser	Lys	Arg	Gly
				170					175					180
Phe	Tyr	Leu	Ala	Phe	Gln	Asp	Ile	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Ile	Leu
				185					190					195
Ser	Leu	Arg	Ile	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Cys	Pro	Ala	Met	Val	Arg	Asn
				200					205					210
Leu	Ala	Ala	Phe	Ser	Glu	Ala	Val	Thr	Gly	Ala	Asp	Ser	Ser	Ser
				215					220					225
Leu	Val	Glu	Val	Arg	Gly	Gln	Cys	Val	Arg	His	Ser	Glu	Glu	Arg
				230					235					240
Asp	Thr	Pro	Lys	Met	Tyr	Cys	Ser	Ala	Glu	Gly	Glu	Trp	Leu	Val
				245					250					255
Pro	Ile	Gly	Lys	Cys	Val	Cys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Glu	Glu	Arg	Arg
				260					265					270
Asp	Ala	Cys	Val	Ala	Cys	Glu	Leu	Gly	Phe	Tyr	Lys	Ser	Ala	Pro
				275					280					285
Gly	Asp	Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Cys	Pro	Pro	His	Ser	His	Ser	Ala
				290					295					300
Ala	Pro	Ala	Ala	Gln	Ala	Cys	His	Cys	Asp	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Arg
				305					310					315
Ala	Ala	Leu	Asp	Pro	Pro	Ser	Ser	Ala	Cys	Thr	Arg	Pro	Pro	Ser
				320					325					330
Ala	Pro	Val	Asn	Leu	Ile	Ser	Ser	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Val	Thr
				335					340					345
Leu	Glu	Trp	Ala	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gly	Gly	Arg	Ser	Asp	Ile
				350					355					360
Thr	Tyr	Asn	Ala	Val	Cys	Arg	Arg	Cys	Pro	Trp	Ala	Leu	Ser	Arg
				365					370					375
Cys	Glu	Ala	Cys	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Phe	Val	Pro	Gln	Gln	Thr
				380					385					390
Ser	Leu	Val	Gln	Ala	Ser	Leu	Leu	Val	Ala	Asn	Leu	Leu	Ala	His
				395					400					405
Met	Asn	Tyr	Ser	Phe	Trp	Ile	Glu	Ala	Val	Asn	Gly	Val	Ser	Asp
				410					415					420
Leu	Ser	Pro	Glu	Pro	Arg	Arg	Ala	Ala	Val	Val	Asn	Ile	Thr	Thr
				425					430					435
Asn	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Val	Val	Val	Ile	Arg	Gln	Glu	Arg
				440					445					450
Ala	Gly	Gln	Thr	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Trp	Gln	Glu	Pro	Glu	Gln
				455					460					465
Pro	Asn	Gly	Ile	Ile	Leu	Glu	Tyr	Glu	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Lys
				470					475					480
Asp	Lys	Glu	Met	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Leu	Lys	Ala	Val	Thr	Thr
				485					490					495
Arg	Ala	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Thr	Arg	Tyr	Val	Phe
				500					505					510
Gln	Val	Arg	Ala	Arg	Thr	Ser	Ala	Gly	Cys	Gly	Arg	Phe	Ser	Gln
				515					520					525
Ala	Met	Glu	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Pro	Arg	Pro	Arg	Tyr	Asp	Thr
				530					535					540
Arg	Thr	Ile	Val	Trp	Ile	Cys	Leu	Thr	Leu	Ile	Thr	Gly	Leu	Val
				545					550					555
Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Cys	Lys	Lys	Arg	His	Cys	Gly	Tyr
				560					565					570
Ser	Lys	Ala	Phe	Gln	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu	Lys	Met	His	Tyr	Gln

				575						580					585
Asn	Gly	Gln	Ala	Pro	Pro	Pro	Val	Phe	Leu	Pro	Leu	His	His	Pro	
				590											600
Pro	Gly	Lys	Leu	Pro	Glu	Pro	Gln	Phe	Tyr	Ala	Glu	Pro	His	Thr	
				605											615
Tyr	Glu	Glu	Pro	Gly	Arg	Ala	Gly	Arg	Ser	Phe	Thr	Arg	Glu	Ile	
				620											630
Glu	Ala	Ser	Arg	Ile	His	Ile	Glu	Lys	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Asp	
				635											645
Ser	Gly	Glu	Val	Cys	Tyr	Gly	Arg	Leu	Arg	Val	Pro	Gly	Gln	Arg	
				650											660
Asp	Val	Pro	Val	Ala	Ile	Lys	Ala	Leu	Lys	Ala	Gly	Tyr	Thr	Glu	
				665											675
Arg	Gln	Arg	Arg	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Ile	Met	Gly	Gln	
				680											690
Phe	Asp	His	Pro	Asn	Ile	Ile	Arg	Leu	Glu	Gly	Val	Val	Thr	Arg	
				695											705
Gly	Arg	Leu	Ala	Met	Ile	Val	Thr	Glu	Tyr	Met	Glu	Asn	Gly	Ser	
				710											720
Leu	Asp	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	His	Asp	Gly	Gln	Phe	Thr	Ile	Met	
				725											735
Gln	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Arg	Tyr	
				740											750
Leu	Ser	Asp	Leu	Gly	Tyr	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	
				755											765
Val	Leu	Val	Asp	Ser	Asn	Leu	Val	Cys	Lys	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	
				770											780
Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Ala	Ala	Tyr	Thr	Thr	
				785											795
Thr	Gly	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr	Ala	Pro	Glu	Ala	Ile	
				800											810
Ala	Phe	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Ala	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	
				815											825
Val	Val	Met	Trp	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Gly	Glu	Arg	Pro	Tyr	Trp	
				830											840
Asn	Met	Thr	Asn	Arg	Asp	Val	Ser	Ala	Lys	Pro	Trp	Gln	Val	Ile	
				845											855
Ser	Ser	Val	Glu	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Pro	Ala	Pro	Met	Gly	Cys	
				860											870
Pro	His	Ala	Leu	His	Gln	Leu	Met	Leu	Asp	Cys	Trp	His	Lys	Asp	
				875											885
Arg	Ala	Gln	Arg	Pro	Arg	Phe	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Val	Leu	Asp	
				890											900
Ala	Leu	Ile	Arg	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Thr	Ala	Thr	Val	
				905											915
Ser	Arg	Cys	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe	Val	Arg	Ser	Cys	Phe	Asp	Leu	
				920											930
Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Val	Gly	Asp	Trp	
				935											945
Leu	Asp	Ser	Ile	Arg	Met	Gly	Arg	Tyr	Arg	Asp	His	Phe	Ala	Ala	
				950											960
Gly	Gly	Tyr	Ser	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Leu	Arg	Met	Asn	Ala	Gln	
				965											975
Asp	Val	Arg	Ala	Leu	Gly	Ile	Thr	Leu	Met	Gly	His	Gln	Lys	Lys	
				980											990
Ile	Leu	Gly	Ser	Ile	Gln	Thr	Met	Arg	Ala	Gln	Leu	Thr	Ser	Thr	
				995											1005
Gln	Gly	Pro	Arg	Arg	His	Leu			1000						
				1010											

<210> 4
 <211> 367
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7472006CD1

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 798

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2902460CD1

<400> 5

```

Met Phe Glu Ala His Ile Gln Ala Gln Ser Ser Ala Ile Gln Ala
 1          5          10          15
Pro Arg Ser Pro Arg Leu Gly Arg Ala Arg Ser Pro Ser Pro Cys

```

				20					25				30	
Pro	Phe	Arg	Ser	Ser	Ser	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Val	Leu	Val	Gln
				35					40					45
Gly	Ala	Arg	Ser	Glu	Glu	Arg	Arg	Thr	Lys	Ser	Trp	Gly	Glu	Gln
				50					55					60
Cys	Pro	Glu	Thr	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Gly	Arg	Lys	Gly	Gly	Pro
				65					70					75
Ser	Leu	Cys	Ser	Ser	Gln	Val	Lys	Lys	Gly	Met	Pro	Pro	Leu	Pro
				80					85					90
Gly	Arg	Ala	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Glu	Ala	Gln	Gly	Pro	Ser	Ala
				95					100					105
Phe	Val	Arg	Met	Glu	Lys	Gly	Ile	Pro	Ala	Ser	Pro	Arg	Cys	Gly
				110					115					120
Ser	Pro	Thr	Ala	Met	Glu	Ile	Asp	Lys	Arg	Gly	Ser	Pro	Thr	Pro
				125					130					135
Gly	Thr	Arg	Ser	Cys	Leu	Ala	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala
				140					145					150
Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Thr	Glu	Val	Ala	Ala	Arg	Val	Thr	Ser	Thr
				155					160					165
Gly	Pro	His	Arg	Pro	Gln	Asp	Leu	Ala	Leu	Thr	Glu	Pro	Ser	Gly
				170					175					180
Arg	Ala	Arg	Glu	Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Pro	Glu	Ala	Leu	Val
				185					190					195
Glu	Arg	Gln	Gly	Gln	Phe	Leu	Gly	Ser	Glu	Thr	Ser	Pro	Ala	Pro
				200					205					210
Glu	Arg	Gly	Gly	Pro	Arg	Asp	Gly	Glu	Pro	Pro	Gly	Lys	Met	Gly
				215					220					225
Lys	Gly	Tyr	Leu	Pro	Cys	Gly	Met	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Pro	Glu
				230					235					240
Val	Gly	Lys	Arg	Pro	Glu	Glu	Thr	Thr	Val	Ser	Val	Gln	Ser	Ala
				245					250					255
Glu	Ser	Ser	Asp	Ala	Leu	Ser	Trp	Ser	Arg	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu
				260					265					270
Ala	Ser	Val	Gly	Pro	Glu	Glu	Ala	Arg	Ser	Gly	Ala	Pro	Val	Gly
				275					280					285
Gly	Gly	Arg	Trp	Gln	Leu	Ser	Asp	Arg	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Pro
				290					295					300
Thr	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Ser	Ala	Gln	Pro	Gly	Thr
				305					310					315
Gly	Asn	Val	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	Ser	Gly	Arg	Met	Leu	Glu	Pro
				320					325					330
Leu	Pro	Cys	Trp	Asp	Ala	Ala	Lys	Asp	Leu	Lys	Glu	Pro	Gln	Cys
				335					340					345
Pro	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Gly	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Arg	Val
				350					355					360
Trp	Gln	Gly	Thr	Met	Glu	Lys	Ala	Gly	Leu	Ala	Trp	Thr	Arg	Gly
				365					370					375
Thr	Gly	Val	Gln	Ser	Glu	Gly	Thr	Trp	Glu	Ser	Gln	Arg	Gln	Asp
				380					385					390
Ser	Asp	Ala	Leu	Pro	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Pro	Gln	Asp	Gln	Asp
				395					400					405
Lys	Pro	Phe	Leu	Arg	Lys	Ala	Cys	Ser	Pro	Ser	Asn	Ile	Pro	Ala
				410					415					420
Val	Ile	Ile	Thr	Asp	Met	Gly	Thr	Gln	Glu	Asp	Gly	Ala	Leu	Glu
				425					430					435
Glu	Thr	Gln	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	Asn	Leu	Pro	Leu	Arg	Lys	Leu
				440					445					450
Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Thr	Gly	Phe	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu
				455					460					465
Asp	Ser	Glu	Glu	Asp	Ile	Ser	Ser	Asp	Pro	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp
				470					475					480
Pro	Asn	Ser	Ala	Phe	Leu	His	Thr	Leu	Asp	Gln	Gln	Lys	Pro	Arg
				485					490					495
Val	Ser	Lys	Ser	Trp	Arg	Lys	Ile	Lys	Asn	Met	Val	His	Trp	Ser
				500					505					510
Pro	Phe	Val	Met	Ser	Phe	Lys	Lys	Lys	Tyr	Pro	Trp	Ile	Gln	Leu
				515					520					525

Ala Gly His Ala Gly Ser Phe Lys Ala Ala Ala Asn Gly Arg Ile
 530 535 540
 Leu Lys Lys His Cys Glu Ser Glu Gln Arg Cys Leu Asp Arg Leu
 545 550 555
 Met Val Asp Val Leu Arg Pro Phe Val Pro Ala Tyr His Gly Asp
 560 565 570
 Val Val Lys Asp Gly Glu Arg Tyr Asn Gln Met Asp Asp Leu Leu
 575 580 585
 Ala Asp Phe Asp Ser Pro Cys Val Met Asp Cys Lys Met Gly Ile
 590 595 600
 Arg Thr Tyr Leu Glu Glu Leu Thr Lys Ala Arg Lys Lys Pro
 605 610 615
 Ser Leu Arg Lys Asp Met Tyr Gln Lys Met Ile Glu Val Asp Pro
 620 625 630
 Glu Ala Pro Thr Glu Glu Glu Lys Ala Gln Arg Ala Val Thr Lys
 635 640 645
 Pro Arg Tyr Met Gln Trp Arg Glu Thr Ile Ser Ser Thr Ala Thr
 650 655 660
 Leu Gly Phe Arg Ile Glu Gly Ile Lys Lys Glu Asp Gly Thr Val
 665 670 675
 Asn Arg Asp Phe Lys Lys Thr Lys Thr Arg Glu Gln Val Thr Glu
 680 685 690
 Ala Phe Arg Glu Phe Thr Lys Gly Asn His Asn Ile Leu Ile Ala
 695 700 705
 Tyr Arg Asp Arg Leu Lys Ala Ile Arg Thr Thr Leu Glu Val Ser
 710 715 720
 Pro Phe Phe Lys Cys His Glu Val Ile Gly Ser Ser Leu Leu Phe
 725 730 735
 Ile His Asp Lys Lys Glu Gln Ala Lys Val Trp Met Ile Asp Phe
 740 745 750
 Gly Lys Thr Thr Pro Leu Pro Glu Gly Gln Thr Leu Gln His Asp
 755 760 765
 Val Pro Trp Gln Glu Gly Asn Arg Glu Asp Gly Tyr Leu Ser Gly
 770 775 780
 Leu Asn Asn Leu Val Asp Ile Leu Thr Glu Met Ser Gln Asp Ala
 785 790 795
 Pro Leu Ala

<210> 6

<211> 358

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 6383934CD1

<400> 6

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

```

Asp Leu Lys Cys Glu Asn Leu Leu Leu Asp Lys Asp Phe Asn Ile
140 145 150
Lys Leu Ser Asp Phe Gly Phe Ser Lys Arg Cys Leu Arg Asp Ser
155 160 165
Asn Gly Arg Ile Ile Leu Ser Lys Thr Phe Cys Gly Ser Ala Ala
170 175 180
Tyr Ala Ala Pro Glu Val Leu Gln Ser Ile Pro Tyr Gln Pro Lys
185 190 195
Val Tyr Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Met Val
200 205 210
Cys Gly Ser Met Pro Tyr Asp Asp Ser Asp Ile Lys Lys Met Leu
215 220 225
Arg Ile Gln Lys Glu His Arg Val Asn Phe Pro Arg Ser Lys His
230 235 240
Leu Thr Cys Glu Cys Lys Asp Leu Ile Tyr His Met Leu Gln Pro
245 250 255
Asp Val Ser Gln Arg Leu His Ile Asp Glu Ile Leu Ser His Ser
260 265 270
Trp Leu Gln Pro Pro Lys Pro Lys Ala Thr Ser Ser Ala Ser Phe
275 280 285
Lys Arg Glu Gly Glu Gly Lys Tyr Arg Ala Glu Cys Lys Leu Asp
290 295 300
Thr Lys Thr Gly Leu Arg Pro Asp His Arg Pro Asp His Lys Leu
305 310 315
Gly Ala Lys Thr Gln His Arg Leu Leu Val Val Pro Glu Asn Glu
320 325 330
Asn Arg Met Glu Asp Arg Leu Ala Glu Thr Ser Arg Ala Lys Asp
335 340 345
His His Ile Ser Gly Ala Glu Val Gly Lys Ala Ser Thr
350 355

```

```

<210> 7
<211> 1049
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3210906CD1

```

```

<400> 7
Met Pro Ala Gly Gly Arg Ala Gly Ser Leu Lys Asp Pro Asp Val
1 5 10 15
Ala Glu Leu Phe Phe Lys Asp Asp Pro Glu Lys Leu Phe Ser Asp
20 25 30
Leu Arg Glu Ile Gly His Gly Ser Phe Gly Ala Val Tyr Phe Ala
35 40 45
Arg Asp Val Arg Asn Ser Glu Val Val Ala Ile Lys Lys Met Ser
50 55 60
Tyr Ser Gly Lys Gln Ser Asn Glu Lys Trp Gln Asp Ile Ile Lys
65 70 75
Glu Val Arg Phe Leu Gln Lys Leu Arg His Pro Asn Thr Ile Gln
80 85 90
Tyr Arg Gly Cys Tyr Leu Arg Glu His Thr Ala Trp Leu Val Met
95 100 105
Glu Tyr Cys Leu Gly Ser Thr Ser Asp Leu Leu Glu Val His Lys
110 115 120
Lys Pro Leu Gln Glu Val Glu Ile Ala Ala Val Thr His Gly Ala
125 130 135
Leu Gln Gly Leu Ala Tyr Leu His Ser His Asn Met Ile His Arg
140 145 150
Asp Val Lys Ala Gly Asn Ile Leu Leu Ser Glu Pro Gly Leu Val
155 160 165
Lys Leu Gly Asp Phe Gly Ser Ala Ser Ile Met Ala Pro Ala Asn
170 175 180
Ser Phe Val Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Leu
185 190 195

```

Ala	Met	Asp	Glu	Gly	Gln	Tyr	Asp	Gly	Lys	Val	Asp	Val	Trp	Ser
				200					205					210
Leu	Gly	Ile	Thr	Cys	Ile	Glu	Leu	Ala	Glu	Arg	Lys	Pro	Pro	Leu
				215					220					225
Phe	Asn	Met	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu	Tyr	His	Ile	Ala	Gln	Asn
				230					235					240
Glu	Ser	Pro	Val	Leu	Gln	Ser	Gly	His	Trp	Ser	Glu	Tyr	Phe	Arg
				245					250					255
Asn	Phe	Val	Asp	Ser	Cys	Leu	Gln	Lys	Ile	Pro	Gln	Asp	Arg	Pro
				260					265					270
Thr	Ser	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	His	Arg	Phe	Val	Leu	Arg	Glu	Arg
				275					280					285
Pro	Pro	Thr	Val	Ile	Met	Asp	Leu	Ile	Gln	Arg	Thr	Lys	Asp	Ala
				290					295					300
Val	Arg	Glu	Leu	Asp	Ser	Leu	Gln	Tyr	Arg	Lys	Met	Lys	Lys	Ile
				305					310					315
Leu	Phe	Gln	Glu	Ala	Pro	Asn	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Ala	Pro	Glu
				320					325					330
Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Glu	Pro	Tyr	Met	His	Leu	Ala	Gly	Thr	Leu
				335					340					345
Thr	Ser	Leu	Glu	Ser	Ser	His	Ser	Val	Pro	Ser	Met	Ser	Ile	Ser
				350					355					360
Ala	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Leu	Ala	Asp	Ala	Ser
				365					370					375
Asp	Asn	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
				380					385					390
Glu	Glu	Gly	Pro	Glu	Ala	Arg	Glu	Met	Ala	Met	Met	Gln	Glu	Gly
				395					400					405
Glu	His	Thr	Val	Thr	Ser	His	Ser	Ser	Ile	Ile	His	Arg	Leu	Pro
				410					415					420
Gly	Ser	Asp	Asn	Leu	Tyr	Asp	Asp	Pro	Tyr	Gln	Pro	Glu	Ile	Thr
				425					430					435
Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Thr	Ser	Thr
				440					445					450
Thr	Ser	Ser	Ala	Arg	Arg	Arg	Ala	Tyr	Cys	Arg	Asn	Arg	Asp	His
				455					460					465
Phe	Ala	Thr	Ile	Arg	Thr	Ala	Ser	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Ile	Gln
				470					475					480
Glu	His	Glu	Gln	Asp	Ser	Ala	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Ser	Gly	Tyr
				485					490					495
Lys	Arg	Met	Arg	Arg	Gln	His	Gln	Lys	Gln	Leu	Leu	Ala	Leu	Glu
				500					505					510
Ser	Arg	Leu	Arg	Gly	Glu	Arg	Glu	Glu	His	Ser	Ala	Arg	Leu	Gln
				515					520					525
Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Gln	Arg	Ala	Gly	Phe	Gly	Ala	Glu	Ala	Glu
				530					535					540
Lys	Leu	Ala	Arg	Arg	His	Gln	Ala	Ile	Gly	Glu	Lys	Glu	Ala	Arg
				545					550					555
Ala	Ala	Gln	Ala	Glu	Glu	Arg	Lys	Phe	Gln	Gln	His	Ile	Leu	Gly
				560					565					570
Gln	Gln	Lys	Lys	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Ala	Gln	Lys	Arg
				575					580					585
Thr	Tyr	Lys	Leu	Arg	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Glu	Glu	Leu	Gln	Glu
				590					595					600
Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Lys	Arg	Glu	Lys	Ala	Glu	Trp	Leu	Leu	Arg
				605					610					615
Gln	Lys	Glu	Gln	Leu	Gln	Gln	Cys	Gln	Ala	Glu	Glu	Glu	Ala	Gly
				620					625					630
Leu	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Gln	Tyr	Phe	Glu	Leu	Gln	Cys	Arg	Gln
				635					640					645
Tyr	Lys	Arg	Lys	Met	Leu	Leu	Ala	Arg	His	Ser	Leu	Asp	Gln	Asp
				650					655					660
Leu	Leu	Arg	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Gln	Thr	Gln	Lys	Asp	Leu
				665					670					675
Glu	Cys	Ala	Leu	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Glu	Ala	Thr	Arg	Glu	Leu
				680					685					690
Glu	Leu	Arg	Gln	Leu	Gln	Ala	Val	Gln	Arg	Thr	Arg	Ala	Glu	Leu

Thr Arg Leu Gln 695 His Gln Thr Glu Leu Gly Asn Gln Leu Glu Tyr 700
 710 715 720
 Asn Lys Arg Arg Glu Gln Glu Leu Arg Gln Lys His Ala Ala Gln 725
 730 735
 Val Arg Gln Gln Pro Lys Ser Leu Lys Ser Lys Glu Leu Gln Ile 740
 745 750
 Lys Lys Gln Phe Gln Glu Thr Cys Lys Ile Gln Thr Arg Gln Tyr 755
 760 765
 Lys Ala Leu Arg Ala His Leu Leu Glu Thr Thr Pro Lys Ala Gln 770
 775 780
 His Lys Ser Leu Leu Lys Arg Leu Lys Glu Glu Gln Thr Arg Lys 785
 790 795
 Leu Ala Ile Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Gln Ser Ile Ser Glu Met 800
 805 810
 Leu Ser Ser Gln Ala Leu Arg Leu Asp Glu Thr Gln Glu Ala Glu 815
 820 825
 Phe Gln Ala Leu Arg Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu Glu Leu Leu 830
 835 840
 Asn Ala Tyr Gln Ser Lys Ile Lys Ile Arg Thr Glu Ser Gln His 845
 850 855
 Glu Arg Glu Leu Arg Glu Leu Glu Gln Arg Val Ala Leu Arg Arg 860
 865 870
 Ala Leu Leu Glu Gln Arg Val Glu Glu Glu Leu Leu Ala Leu Gln 875
 880 885
 Thr Gly Arg Ser Glu Arg Ile Arg Ser Leu Leu Glu Arg Gln Ala 890
 895 900
 Arg Glu Ile Glu Ala Phe Asp Ala Glu Ser Met Arg Leu Gly Phe 905
 910 915
 Ser Ser Met Ala Leu Gly Gly Ile Pro Ala Glu Ala Ala Ala Gln 920
 925 930
 Gly Tyr Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Trp Pro Ser Arg Pro 935
 940 945
 Val Pro Arg Ser Ser Gly Ala His Trp Ser His Gly Pro Pro Pro Pro 950
 955 960
 Gly Met Pro Pro Pro Ala Trp Arg Gln Pro Ser Leu Leu Ala Pro 965
 970 975
 Pro Gly Pro Pro Asn Trp Leu Gly Pro Pro Thr Gln Ser Gly Thr 980
 985 990
 Pro Arg Gly Gly Ala Leu Leu Leu Leu Arg Asn Ser Pro Gln Pro 995
 1000 1005
 Leu Arg Arg Ala Ala Ser Gly Gly Ser Gly Ser Glu Asn Val Gly 1010
 1015 1020
 Pro Pro Ala Ala Ala Val Pro Gly Pro Leu Ser Arg Ser Thr Ser 1025
 1030 1035
 Val Ala Ser His Ile Leu Asn Gly Ser Ser His Phe Tyr Ser 1040
 1045

<210> 8

<211> 322

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 3339024CD1

<400> 8

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

				65					70					75
Ala	Gly	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Ala	Val	Arg	Leu	Asn	Ile	Ser	Tyr
				80					85					90
Pro	Pro	Gln	Asn	Leu	Thr	Met	Thr	Val	Phe	Gln	Gly	Asp	Gly	Thr
				95					100					105
Ala	Ser	Thr	Thr	Leu	Arg	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Ser	Val	Leu	Glu
				110					115					120
Gly	Gln	Ser	Leu	His	Leu	Val	Cys	Ala	Val	Asp	Ser	Asn	Pro	Pro
				125					130					135
Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Trp	Gly	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Ser
				140					145					150
Gln	Ser	Ser	Asn	Leu	Gly	Val	Leu	Glu	Leu	Pro	Arg	Val	His	Val
				155					160					165
Lys	Asp	Glu	Gly	Glu	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Gln	Asn	Pro	Leu	Gly
				170					175					180
Ser	Gln	His	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gln	Asn	Glu	Tyr	Thr
				185					190					195
Gly	Lys	Met	Arg	Pro	Ile	Ser	Gly	Val	Thr	Leu	Gly	Ala	Phe	Gly
				200					205					210
Gly	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Tyr	Phe	Cys	Ile	Ile
				215					220					225
Phe	Val	Val	Val	Arg	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Ser	Ala	Arg	Pro	Ala
				230					235					240
Val	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Gly	Met	Glu	Asp	Ala	Asn	Ala	Val	Trp
				245					250					255
Gly	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Pro	Leu	Ile	Glu	Ser	Pro	Ala	Asp	Asp
				260					265					270
Ser	Pro	Pro	His	His	Ala	Pro	Pro	Ala	Leu	Ala	Thr	Pro	Ser	Pro
				275					280					285
Glu	Glu	Gly	Glu	Ile	Gln	Tyr	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	His	Lys	Ala
				290					295					300
Arg	Pro	Gln	Tyr	Pro	Gln	Glu	Gln	Glu	Ala	Ile	Gly	Tyr	Glu	Tyr
				305					310					315
Ser	Glu	Ile	Asn	Ile	Pro	Lys								
				320										

<210> 9
 <211> 1212
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 4436929CD1

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

				155					160					165
Glu	Val	Lys	Leu	Val	Asp	Phe	Gly	Val	Ser	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg
				170					175					180
Thr	Val	Gly	Arg	Arg	Asn	Thr	Phe	Ile	Gly	Thr	Pro	Tyr	Trp	Met
				185					190					195
Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Ala	Cys	Asp	Glu	Asn	Pro	Asp	Ala	Thr	Tyr
				200					205					210
Asp	Tyr	Arg	Ser	Asp	Leu	Trp	Ser	Cys	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile	Glu
				215					220					225
Met	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Pro	Leu	Cys	Asp	Met	His	Pro	Met	Arg
				230					235					240
Ala	Leu	Phe	Leu	Ile	Pro	Arg	Asn	Pro	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Ser
				245					250					255
Lys	Lys	Trp	Ser	Lys	Lys	Phe	Phe	Ser	Phe	Ile	Glu	Gly	Cys	Leu
				260					265					270
Val	Lys	Asn	Tyr	Met	Gln	Arg	Pro	Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	Lys
				275					280					285
His	Pro	Phe	Ile	Arg	Asp	Gln	Pro	Asn	Glu	Arg	Gln	Val	Arg	Ile
				290					295					300
Gln	Leu	Lys	Asp	His	Ile	Asp	Arg	Thr	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Glu
				305					310					315
Lys	Asp	Glu	Thr	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Gly	Ser	Glu	Glu	Glu	Glu
				320					325					330
Glu	Glu	Val	Pro	Glu	Gln	Glu	Gly	Glu	Pro	Ser	Ser	Ile	Val	Asn
				335					340					345
Val	Pro	Gly	Glu	Ser	Thr	Leu	Arg	Arg	Asp	Phe	Leu	Arg	Leu	Gln
				350					355					360
Gln	Glu	Asn	Lys	Glu	Arg	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Arg	Gln	Gln	Leu
				365					370					375
Leu	Gln	Glu	Gln	Gln	Leu	Arg	Glu	Gln	Glu	Glu	Tyr	Lys	Arg	Gln
				380					385					390
Leu	Leu	Ala	Glu	Arg	Gln	Lys	Arg	Ile	Glu	Gln	Gln	Lys	Glu	Gln
				395					400					405
Arg	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Gln	Gln	Arg	Arg	Glu	Arg	Glu	Ala	Arg
				410					415					420
Arg	Gln	Gln	Glu	Arg	Glu	Gln	Arg	Arg	Arg	Glu	Gln	Glu	Glu	Lys
				425					430					435
Arg	Arg	Leu	Glu	Glu	Leu	Glu	Arg	Arg	Arg	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu
				440					445					450
Arg	Arg	Arg	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Arg	Arg	Val	Glu	Arg	Glu	Gln
				455					460					465
Glu	Tyr	Ile	Arg	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Gln	Arg	His	Leu	Glu
				470					475					480
Val	Leu	Gln	Gln	Gln	Leu	Leu	Gln	Glu	Gln	Ala	Met	Leu	Leu	His
				485					490					495
Asp	His	Arg	Arg	Pro	His	Pro	Gln	His	Ser	Gln	Gln	Pro	Pro	Pro
				500					505					510
Pro	Gln	Gln	Glu	Arg	Ser	Lys	Pro	Ser	Phe	His	Ala	Pro	Glu	Pro
				515					520					525
Lys	Ala	His	Tyr	Glu	Pro	Ala	Asp	Arg	Ala	Arg	Glu	Val	Glu	Asp
				530					535					540
Arg	Phe	Arg	Lys	Thr	Asn	His	Ser	Ser	Pro	Glu	Ala	Gln	Ser	Lys
				545					550					555
Gln	Thr	Gly	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	Ser	Arg	Ser	Glu
				560					565					570
Ser	Phe	Ser	Asn	Gly	Asn	Ser	Glu	Ser	Val	His	Pro	Ala	Leu	Gln
				575					580					585
Arg	Pro	Ala	Glu	Pro	Gln	Val	Pro	Val	Arg	Thr	Thr	Ser	Arg	Ser
				590					595					600
Pro	Val	Leu	Ser	Arg	Arg	Asp	Ser	Pro	Leu	Gln	Gly	Ser	Gly	Gln
				605					610					615
Gln	Asn	Ser	Gln	Ala	Gly	Gln	Arg	Asn	Ser	Thr	Ser	Ser	Ile	Glu
				620					625					630
Pro	Arg	Leu	Leu	Trp	Glu	Arg	Val	Glu	Lys	Leu	Val	Pro	Arg	Pro
				635					640					645
Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Ser	Gly	Ser	Gln	Pro
				650					655					660

Gly	Ser	His	Pro	Gly	Ser	Gln	Ser	Gly	Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Arg
				665					670					675
Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Glu	Gly	Ser	Pro	Ser	Gln	Arg	Leu
				680					685					690
Glu	Asn	Ala	Val	Lys	Lys	Pro	Glu	Asp	Lys	Lys	Glu	Val	Phe	Arg
				695					700					705
Pro	Leu	Lys	Pro	Ala	Gly	Glu	Val	Asp	Leu	Thr	Ala	Leu	Ala	Lys
				710					715					720
Glu	Leu	Arg	Ala	Val	Glu	Asp	Val	Arg	Pro	Pro	His	Lys	Val	Thr
				725					730					735
Asp	Tyr	Ser	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ser	Gly	Thr	Thr	Asp	Glu	Glu
				740					745					750
Asp	Asp	Asp	Val	Glu	Gln	Glu	Gly	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Gly
				755					760					765
Pro	Glu	Asp	Thr	Arg	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Asn	Gly
				770					775					780
Glu	Thr	Glu	Ser	Val	Lys	Thr	Met	Ile	Val	His	Asp	Asp	Val	Glu
				785					790					795
Ser	Glu	Pro	Ala	Met	Thr	Pro	Ser	Lys	Glu	Gly	Thr	Leu	Ile	Val
				800					805					810
Arg	Gln	Thr	Gln	Ser	Ala	Ser	Ser	Thr	Leu	Gln	Lys	His	Lys	Ser
				815					820					825
Ser	Ser	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Ile	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Gln	Ile
				830					835					840
Ser	Pro	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Ser	Val	Val	Gly	Phe	Ser
				845					850					855
Cys	Asp	Gly	Met	Arg	Pro	Glu	Ala	Ile	Arg	Gln	Asp	Pro	Thr	Arg
				860					865					870
Lys	Gly	Ser	Val	Val	Asn	Val	Asn	Pro	Thr	Asn	Thr	Arg	Pro	Gln
				875					880					885
Ser	Asp	Thr	Pro	Glu	Ile	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Arg	Phe	Asn	Ser
				890					895					900
Glu	Ile	Leu	Cys	Ala	Ala	Leu	Trp	Gly	Val	Asn	Leu	Leu	Val	Gly
				905					910					915
Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Met	Leu	Leu	Asp	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Lys
				920					925					930
Val	Tyr	Pro	Leu	Ile	Asn	Arg	Arg	Arg	Phe	Gln	Gln	Met	Asp	Val
				935					940					945
Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Lys	Lys	Asp
				950					955					960
Lys	Leu	Arg	Val	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Trp	Leu	Arg	Asn	Lys	Ile	Leu
				965					970					975
His	Asn	Asp	Pro	Glu	Val	Glu	Lys	Lys	Gln	Gly	Trp	Thr	Thr	Val
				980					985					990
Gly	Asp	Leu	Glu	Gly	Cys	Val	His	Tyr	Lys	Val	Val	Lys	Tyr	Glu
				995					1000					1005
Arg	Ile	Lys	Phe	Leu	Val	Ile	Ala	Leu	Lys	Ser	Ser	Val	Glu	Val
				1010					1015					1020
Tyr	Ala	Trp	Ala	Pro	Lys	Pro	Tyr	His	Lys	Phe	Met	Ala	Phe	Lys
				1025					1030					1035
Ser	Phe	Gly	Glu	Leu	Val	His	Lys	Pro	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Thr
				1040					1045					1050
Val	Glu	Glu	Gly	Gln	Arg	Leu	Lys	Val	Ile	Tyr	Gly	Ser	Cys	Ala
				1055					1060					1065
Gly	Phe	His	Ala	Val	Asp	Val	Asp	Ser	Gly	Ser	Val	Tyr	Asp	Ile
				1070					1075					1080
Tyr	Leu	Pro	Thr	His	Ile	Gln	Cys	Ser	Ile	Lys	Pro	His	Ala	Ile
				1085					1090					1095
Ile	Ile	Leu	Pro	Asn	Thr	Asp	Gly	Met	Glu	Leu	Leu	Val	Cys	Tyr
				1100					1105					1110
Glu	Asp	Glu	Gly	Val	Tyr	Val	Asn	Thr	Tyr	Gly	Arg	Ile	Thr	Lys
				1115					1120					1125
Asp	Val	Val	Leu	Gln	Trp	Gly	Glu	Met	Pro	Thr	Ser	Val	Ala	Tyr
				1130					1135					1140
Ile	Arg	Ser	Asn	Gln	Thr	Met	Gly	Trp	Gly	Glu	Lys	Ala	Ile	Glu
				1145					1150					1155
Ile	Arg	Ser	Val	Glu	Thr	Gly	His	Leu	Asp	Gly	Val	Phe	Met	His

1160 1165 1170
 Lys Arg Ala Gln Arg Leu Lys Phe Leu Cys Glu Arg Asn Asp Lys
 1175 1180 1185
 Val Phe Phe Ala Ser Val Arg Ser Gly Gly Ser Ser Gln Val Tyr
 1190 1195 1200
 Phe Met Thr Leu Gly Arg Thr Ser Leu Leu Ser Trp
 1205 1210

<210> 10
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5046791CD1

<400> 10
 Met Gln Pro Leu Arg Val Asn Ser Gln Pro Gly Pro Gln Lys Arg
 1 5 10 15
 Cys Leu Phe Val Cys Arg His Gly Glu Arg Met Asp Val Val Phe
 20 25 30
 Gly Lys Tyr Trp Leu Ser Gln Cys Phe Asp Ala Lys Gly Arg Tyr
 35 40 45
 Ile Arg Thr Asn Leu Asn Met Pro His Ser Leu Pro Gln Arg Ser
 50 55 60
 Gly Gly Phe Arg Asp Tyr Glu Lys Asp Ala Pro Ile Thr Val Phe
 65 70 75
 Gly Cys Met Gln Ala Arg Leu Val Gly Glu Ala Leu Leu Glu Ser
 80 85 90
 Asn Thr Ile Ile Asp His Val Tyr Cys Ser Pro Ser Leu Arg Cys
 95 100 105
 Val Gln Thr Ala His Asn Ile Leu Lys Gly Leu Gln Gln Glu Asn
 110 115 120
 His Leu Lys Ile Arg Val Glu Pro Gly Leu Phe Glu Trp Thr Lys
 125 130 135
 Trp Val Ala Gly Ser Thr Leu Pro Ala Trp Ile Pro Pro Ser Glu
 140 145 150
 Leu Ala Ala Ala Asn Leu Ser Val Asp Thr Thr Tyr Arg Pro His
 155 160 165
 Ile Pro Ile Ser Lys Leu Val Val Ser Glu Ser Tyr Asp Thr Tyr
 170 175 180
 Ile Ser Arg Ser Phe Gln Val Thr Lys Glu Ile Ile Ser Glu Cys
 185 190 195
 Lys Ser Lys Gly Asn Asn Ile Leu Ile Val Ala His Ala Ser Ser
 200 205 210
 Leu Glu Ala Cys Thr Cys Gln Leu Gln Gly Leu Ser Pro Gln Asn
 215 220 225
 Ser Lys Asp Phe Val Gln Met Val Arg Lys Ile Pro Tyr Leu Gly
 230 235 240
 Phe Cys Ser Cys Glu Glu Leu Gly Glu Thr Gly Ile Trp Gln Leu
 245 250 255
 Thr Asp Pro Pro Ile Leu Pro Leu Thr His Gly Pro Thr Gly Gly
 260 265 270
 Phe Asn Trp Arg Glu Thr Leu Leu Gln Glu
 275 280

<210> 11
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1416174CD1

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 3244919CD1

<400> 12
 Met Gly Ser Ser Met Ser Ala Ala Thr Ala Arg Arg Pro Val Phe
 1 5 10 15
 Asp Asp Lys Glu Asp Val Asn Phe Asp His Phe Gln Ile Leu Arg
 20 25 30
 Ala Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Cys Ile Val Gln Lys
 35 40 45
 Arg Asp Thr Glu Lys Met Tyr Ala Met Lys Tyr Met Asn Lys Gln
 50 55 60
 Gln Cys Ile Glu Arg Asp Glu Val Arg Asn Val Phe Arg Glu Leu
 65 70 75
 Glu Ile Leu Gln Glu Ile Glu His Val Phe Leu Val Asn Leu Trp
 80 85 90
 Tyr Ser Phe Gln Asp Glu Glu Asp Met Phe Met Val Val Asp Leu
 95 100 105
 Leu Leu Gly Gly Asp Leu Arg Tyr His Leu Gln Gln Asn Val Gln
 110 115 120
 Phe Ser Glu Asp Thr Val Arg Leu Tyr Ile Cys Glu Met Ala Leu
 125 130 135
 Ala Leu Asp Tyr Leu Arg Gly Gln His Ile Ile His Arg Asp Val
 140 145 150
 Lys Pro Asp Asn Ile Leu Leu Asp Glu Arg Gly His Ala His Leu
 155 160 165
 Thr Asp Phe Asn Ile Ala Thr Ile Ile Lys Asp Gly Glu Arg Ala
 170 175 180
 Thr Ala Leu Ala Gly Thr Lys Pro Tyr Met Ala Pro Glu Ile Phe
 185 190 195
 His Ser Phe Val Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Ser Phe Glu Val Asp
 200 205 210
 Trp Trp Ser Val Gly Val Met Ala Tyr Glu Leu Leu Arg Gly Trp
 215 220 225
 Arg Pro Tyr Asp Ile His Ser Ser Asn Ala Val Glu Ser Leu Val
 230 235 240
 Gln Leu Phe Ser Thr Val Ser Val Gln Tyr Val Pro Thr Trp Ser
 245 250 255
 Lys Glu Met Val Ala Leu Leu Arg Lys Leu Leu Thr Val Asn Pro
 260 265 270
 Glu His Arg Leu Ser Ser Leu Gln Asp Val Gln Ala Ala Pro Ala
 275 280 285
 Leu Ala Gly Val Leu Trp Asp His Leu Ser Glu Lys Arg Val Glu
 290 295 300

```

Pro Gly Phe Val Pro Asn Lys Gly Arg Leu His Cys Asp Pro Thr
          305          310
Phe Glu Leu Glu Glu Met Ile Leu Glu Ser Arg Pro Leu His Lys
          320          325
Lys Lys Lys Arg Leu Ala Lys Asn Lys Ser Arg Asp Asn Ser Arg
          335          340
Asp Ser Ser Gln Ser Ala Pro Arg Ser Lys Ser Lys Pro Ser Thr
          350          355
Gln Arg Gln Gly Ser Trp Ala Leu Ala Ser Ser Gly Leu Gly Glu
          365          370

```

```

<210> 13
<211> 1859
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 058860CB1

```

```

<400> 13
gagagatact ccacaccccc aggagagact ctagagagat attccacacc cccaggagag 60
actctgggaga gatactccac acccccagga gagactctag agcgatattc cacaccccc 120
ggggaggcac tagagagata ttctattct actggaggac caaaccccac tggactttt 180
aaaacatatac catcaaaaat agaaatggaa gacggtacac caaatgagca tttctacaca 240
cctacagaag agaggggttc agcttatgaa atatggcggt ccgattcatt tggtagaccc 300
aatgaagcca ttgagccaaa agacaatgaa atgcctccat cttttattga acctctgacc 360
aaaaggaaggg tatatgaaaa cacaaacta ggcttcattg ttgaagttga aggtcttcca 420
gttcctgggt tgaaatggta tcgaaataaa tctttactag agccagatga aagaatcaaa 480
atggaaaagag tgggtaatgt gtgttcaact gaaatttcta acattcaaaa aggagaaggg 540
ggagagtaca tgggtcatgc tgtaaacatc ataggggaag caaagagctt tgcaaatgta 600
gacataatgc cccaggaaga aagagtgggt gcactaccac ctccagtaac acatcagcat 660
gtcatggagt ttgatttggg acacaccaca tcatcaagaa caccttctcc tcaagaaatt 720
gtcctggaag ttgaattaag tgaaaaagac gttaaagaat ttgagaagca ggtgaaaata 780
gtgacagttc ccgaatttac tctgaccat aaaagtatga ttgtgagtct agatgttctt 840
ccatttaatt ttgtagatcc aaatatggat tcaagggagg gagaagacaa agaactaaaa 900
attgatttag aagtatttga aatgcctcct cgctttataa tgcctatttg tgattttaaa 960
attccagaaa attcagatgc tgtattcaaa tgttcagtca tagggatccc gactcccga 1020
gttaagtggg ataaagaata tatgtgtatt gagccagata atattaaata cgtgattagc 1080
gaggagaagg gaagtccacac tcttaaaat cgaaatgtct gtctttctga tagtgcaaca 1140
tacaggtgca gagctgtgaa ttgtgtagga gaggctatct gtccgggatt cctcaccatg 1200
ggagattctg aaatatttgc tgtgatagca aagaaaagca aagtgacttt aagcagttta 1260
atggaagaat tggctctaaa gagcaactac acagacagtt tttttgaatt tcaggtggtg 1320
gaagggcctc ccagggttat caaaggtatt tctgactggt atgcaccaat aggtacagca 1380
gcataatctc agtgcttagt tctgtgctct ccaagaccca cggtttactg gtacaaaagat 1440
ggaaaattag tccaaggaag aaggttcact gttgagggaa gtggcacagg gttccataac 1500
ctgtttataa caagcttagt aaagagtgat gaaggagagt ataggtgtgt agctacaaac 1560
aaatcaggaa tggctgagag ctttgcagca ctcaccttaa cttaaaatgt aatgttttag 1620
tgctcagta attattagca ttgatctgag tgctttcata ttttccaaat tatgtggatc 1680
taataaactt ccaaacaggt ccaccatatt tgaattcatt accttgagga ccctaaaga 1740
aataatctct atgtagaat ctcactcttg taatacatgt aaatattttg ttatctgaac 1800
tgtggaatca tcacttgtgt caatcatgct gtgtaatatc aaacacaatt aaatctctc 1859

```

```

<210> 14
<211> 3501
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2041716CB1

```

```

<400> 14
gtggtgtggc tgcagtgagg agttcccaac aaggctacgc agaagaacc ccttgactga 60
agcaatggag gggggtccag ctgtctgctg ccaggatcct cgggcagagc tggtagaacg 120
ggtggcagcc atcgatgtga ctcaacttga ggaggcagat ggtggcccag agcctactag 180

```

```

aacgggtgtg gacccccac cacgggcccag agctgcctct gtgatccctg gcagtacttc 240
aagactgctc ccagcccggc ctagcctctc agccaggaag ctttcctac aggagcggcc 300
agcaggaaagc tatctggagg cgcaggctgg gccttatgcc acggggcctg ccagccacat 360
ctccccccgg gctggcggga ggcccaccat caggtccac cacgtggcca tctcagatgc 420
agaggactgt gtgcagctga accagtacaa gctgcagagt gagattggca aggtggggct 480
gactgatgcc tatctgcagg gtgcctacgg tgtgggtgagg ctggcctaca acgaaagtga 540
agacagacac tatgcaatga aagtcccttc caaaaagaag ttactgaagc agtatggctt 600
tccacgtcgc cctccccga gagggtocca ggctgccag ggaggaccag ccaagcagct 660
gctgccctct gagcgggtgt accaggagat tgccatcctg aagaagctgg acccgtgaa 720
tgtggtaaaa ctgatcagag tcctggatga ccagctgag gacaacctct atttggttga 780
cctcctgaga aaggggcccg tcatggaagt gccctgtgac aagccttct cggaggagca 840
agctgcctc tacctgcccg acgtcatcct gggcctcgag tacttgcact gccagaagat 900
cgtccacagg gacatcaagc catccaacct gctcctgggg gatgatgggc acgtgaagat 960
cgccgacttt ggcctcagca accagtttga ggggaacgac gctcagctgt ccagcagcgc 1020
gggaacccca gcatctatgg ccccagggc catttctgat tccggccaga gcttcagttg 1080
gaaggccttg gatgtatggg ccactggcgt cacgtgttac tgccttctct atgggaagtg 1140
ccggttcacg gacgatttca tcctggcctc ccacaggaag atcaagaatg agcccgtgtg 1200
gtttcctgag gagccagaaa tcagcgagga gctcaaggac ctgacctga agatgttaga 1260
caagaatccc gagacgagaa ttggggtgcc agacatcaag ttgaccctt ggggtgaccaa 1320
gaacggggag gagcccctc cttcggagga ggagcactgc agcgtgggtg aggtgacaga 1380
ggaggaggtt aagaactcag tcaggtctcat ccccagctgg accacggtga tccctgtgaa 1440
gtccatgctg aggaagcgtt cctttgggaa cccgtttgag cccaagcac ggagggaaga 1500
gcgatccatg tctgtccag gaaacctact ggtgaaagaa ggttttggtg aagggggcaa 1560
gagcccagag ctccccggcg tccaggaaga cgaggtgca tctgagccc ctgcatgcac 1620
ccagggccac ccggcagcac actcatcccg cgcctcaga ggcccaccc tcatgcaaca 1680
gccgcccccg caggcagggg gctggggact gcagcccac tcccgcctt ccccatcgt 1740
gctgcagcac cccacgcac gacgtccag ggacagactg gaatgtatgt catttgggtg 1800
cttgggggca gggctcccac gaggccatcc tcctctctt ggacctctt ggcctgacct 1860
attctgtggg gaaaccgggt gccatggag cctcagaaat gccaccggc tggttggcat 1920
ggcctggggc aggaggcaga ggcaggagac caagatggca ggtggaggcc aggttacca 1980
caaccgaaga gacctcccgc tggggccggg caggcctggc tcagctgcca caggcatatg 2040
gtggagaggg ggtaccctg cccaccttgg ggtggtggca ccagagctct tgtctattca 2100
gacgctggta tgggggctcg gaacctcac tggggacagg gccagtgttg gagaattctg 2160
attcctttt tgttctctt tactttgtt tttaacctgg ggttcgggg agaggcctg 2220
cttgggaaca tctcagagc tttcctacat ctccgtggt tcccagcaca gcccaagatt 2280
atthggcagc caagtggatg gaactaactt tcctggactg tgtttcgcat tcggcgttat 2340
ctggaaaagt gactgaacgg aatcaagctc tgagcagagg cctgaagcgg aagcaccaca 2400
tcgtccctgc ccatctcact ctctccctg atgatgccc tagagctgag gctggagaag 2460
acaccagggc tgactttgac cgagggccat ggacgcgaca ggcctgtggc cctgcacatg 2520
ctgaaaatac tgaaccacg cctctctcc tacaccggc taccatctg ggccaagag 2580
ctgcactcac actcctacaa cgaaggacaa actgtccagg tcggagggat cacagacac 2640
agaacctgga ggggtgtgca cgctggcagg tggcctctgc gccaatggc tcacctgag 2700
gacatcagca gtcagcctgc tcagagcggg ggtgctggag cgcgtgcaga cacagctct 2760
ccggagcagc ctccacctc tctctgggat cagtgtccgg ctggccgacg tggcatttgc 2820
tgaccgaatg ctcatagagg ttgaccccc cagggtcacg caggactcgg acactgcct 2880
ggaaacatgg atggacaagg gcttttggcc acaggtgtgg gtgtcctgtt ggaggagggc 2940
ttgtttggag aagggaggct ggctggggga gaaaccgga tcccgtgca tctccgcgc 3000
tgtgggtgca tgtcgcgtg tcatctgttg cacacagctc actcgtatgt cctgactgg 3060
tacatgcato tghtaatacag tttctacgtc tatttaaggc taggagccga atgtgcccc 3120
ttgtcagttg gtcacgttt ctcccggct cctctgggct aaggcagttt ggcccagggc 3180
ttaaaaagtt actcggctact gtttttaaga acactttat agagttagt gaagcagagt 3240
taagagccaa tcaactgatc ccaagtgtt cttgagcate tggctcgggg ggaccactt 3300
gatcggaccc acccttggaa agctcagggg tagggccagg tgggatgctc accctgtcac 3360
tgaggggttt gtttggcatc gttgtttttg aatgtagcac aagcagatgag caaactctat 3420
aagagtgttt taaaaattaa cttcccagga agtgagttaa aaacaataa agccctttct 3480
tgagttaaaa agaaaaaaaa a 3501

```

```

<210> 15
<211> 3039
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472005CB1

<400> 15

```

```

atggcccccg cccggggccg cctgccccct gcgctctggg tcgtcacggc cgcggcggcg 60
gcyggccacct gcgtgtccgc ggcgcgcggc gaagtgaatt tgctggacac gtcgaccatc 120
cacgggggact ggggctggct cacgtatccg gctcatgggt gggactccat caacgaggtg 180
gacgagtcct tccagcccat ccacacgtac caggtttgca acgtcatgag ccccaaccag 240
aacaactggc tgcgcacgag ctgggtcccc cgagacggcg cccggcgcgt ctatgctgag 300
atcaagttta ccctgcgcga ctgcaacagc atgcctgggt tgctgggcac ctgcaaggag 360
accttcaacc tctactacct ggagtcggac cgcgacctgg gggccagcac acaagaaagc 420
cagttcctca aaatcgacac cattgcccgc gacgagagct tcacaggtgc cgaccttgg 480
gtcggcgctc tcaagctcaa cacggagggt cgagtggtgg gtccccctag caagcggc 540
ttctacctgg ccttccagga cataggtgcc tgcctggcca tctctctctc ccgcatctac 600
tataagaagt gccctgccat ggtgcgcaat ctggctgcct tctcggagge agtgacgggg 660
gccgactcgt cctcactggg ggaggtgagg gccagtgcg tgccgcactc agaggagcgg 720
gacacacca agatgtactg cagcgcggag ggcgagtgge tcgtgcccat cggcaaatgc 780
gtgtgcagtg ccggctacga ggagcggcgg gatgcctgtg tggcctgtga gctgggcttc 840
tacaagttag cccctgggga ccagctgtgt gccctgcc ctccccacag ccatccgca 900
getccagcgg cccaagcctg ccaactgtgac ctcaactact accgtgcagc cctggaccgg 960
ccgtctctag cctgcacccg gccaccctcg gcaccagtga acctgatctc cagtgtaat 1020
gggacatcag tgactctgga gtgggcccct ccctggacc caggtgggcg cagtgcacat 1080
acctacaatg ccgtgtccg ccgtgcccc tgggcactga gccctgcca ggcattgtgg 1140
agcggcacc cccttctgccc ccagcagaca agcctgggtc agggccagcct gctgggtggc 1200
aacctgctgg cccacatgaa agccccgcgg ggcctgtgtg gtaacatca ccacgaacca ggcagcccg 1320
tccaggtgg tggatgaccg tcaagagcgg gggggcaga ccagcgtctc gctgctgtgg 1380
caggagcccc agcagccgaa cggcatcatc ctccacctc aaggcgtca ccaccagagc caccgctcc 1500
ggcctcaagc cgggaccccg ctactgttcc caggctccag cccgcacctc agcaggctgt 1560
ggccgcttca gccaggccat ggaggtggag accgggaaac cccggccccg ctatgacacc 1620
aggaccattg tctggatctg cctgacgtc atcacgggcc tgggtgtgct tctgctctg 1680
ctcatctgca agaagaggca ctgtggctac agcaaggcct tccaggactc ggacgaggag 1740
aagatgcact atcagaatgg acaggcaccc ccacctgtct tctgcctctc gcatcacc 1800
ccgggaaagc tcccagagcc ccagttctat ggggaacccc acacctaga ggagccagge 1860
cggggcgggg ccagtttcac tcgggagatc gaggcctcta ggatccacat cgagaaaatc 1920
atcggctctg gagactccgg ggaagtctgc tacgggaggc tgccgggtgc agggcagcgg 1980
gatgtgcccc tggccatcaa ggcctcaaa gccggctaca cggagagaca gaggcggggc 2040
ttcctgagcg agcgtccat catggggcaa ttcgaccatc ccaacatcat ccgctcggag 2100
ggtgtcgtca cccgtggccg cctggcaatg atgtgactg agtacatgga gaacggctct 2160
ctggacacct tcctgaggac ccacgacggg cagttcacca tcatgcagct ggtgggcatt 2220
ctgagaggag tgggtgccgg catgcgtac ctctcagacc tgggctatgt ccaccgagac 2280
ctggccgccc gcaacgtcct ggttgacagc aacctggtct gcaaggtgtc tgacttcggg 2340
ctctcacggg tgctggagga cgacccggat gctgcctaca ccaccagggc cgggaagatc 2400
ccatccgct ggaaggccc agaggccatc gcctccgca ccttctctc ggcagcgac 2460
gtgtggagct tcggcgtggt catgtgggag gtgctggcct atggggagcg gccctactgg 2520
aacatgacca accgggatgt gagtgcaag ccttggcagg tcatcagctc tctggaggag 2580
gggtaccgcc tggccgccc catgggctgc ccccacgccc tgcaccagct catgctcgac 2640
tgttggcaca aggacccggc gcagcggcct cgcttctcc agattgtcag tgcctcgat 2700
gcgtctatcc gcagccctga gagtctcagg gccaccgcca cagtcagcag gtgcccacc 2760
cctgccttcg tccggagctg ctttgacctc cgagggggca gcggtggcgg tgggggctc 2820
accgtggggg actggctgga ctccatccgc atgggcccgt accgagacca ctctcgtcgg 2880
ggcggatact cctctctggg catggtgcta cgcattgaac cccaggacgt gcgcgccctg 2940
ggcatcacc tcatgggcca ccagaagaag atcctgggca gcatcagac catgcccggc 3000
cagctgacca gcacccaggg gccccgcgg cacctctga 3039

```

```

<210> 16
<211> 1104
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472006CB1

```

```

<400> 16
atggatgacg ctgctgtcct caagcgacga ggctacctcc tggggataaa ttaggagag 60
ggctcctatg caaaagtaaa atctgcttac tctgagcgc tgaagttaa tgtgggatc 120
aagatcatcg accgcaagaa ggccccgca gacttcttgg agaaatcct tccccggaa 180
atlgagattc tggccatggt aaaccactgc tccatcatta agacctacga gatctttgag 240
acatcacatg gcaaggtcta catcgtcatg gagctcgcag tccagggcca cctcctcgag 300

```

ttaatcaaaa	cccggggagc	cctgcatgag	gacgaagctc	gcaagaagtt	ccaccagctt	360
tccttgGCCa	tcaagtactg	ccacgacctg	gacgtctgcc	accgggacct	caagtgtgac	420
aaccttctcc	ttgacaagga	cttcaacatc	aagctgtccg	acttcagctt	ctccaagcgc	480
tgcctgcggg	atgacagtgg	tcgaaatggcc	ttaagcaaga	cctctctgtgg	gtcaccagcg	540
tatgCGGCCc	cagaggtgct	gcagggcatt	ccctaccagc	ccaaggtgta	cgacatctgg	600
agcctagggc	tgatcctcta	catcatggtc	tgCGGctcca	tgccctacga	cgactccaac	660
atcaagaaga	tgctgcgtat	ccagaaggag	caccgctca	acttcccacg	ctccaagcac	720
ctgacagggc	agtgcaagga	cctcatctac	cacatgtctg	agcccagcgt	caaccggcgg	780
ctccacatcg	acgagatcct	cagccactgc	tggtatgcagc	ccaaggcacg	gggatctccc	840
tctgtggcca	tcaacaagga	gggggagagt	tccccgggaa	ctgaaccctt	gtggaccccc	900
gaacctggct	ctgacaagaa	gtctgccacc	aagctggagc	ctgagggaga	ggcacagccc	960
caggcacagc	ctgagacaaa	acccgagggg	acagcaatgc	aaatgtccag	gcagtgggag	1020
atcctgggtt	tccccagcaa	gCGctcgact	atggagacag	aggaagggcc	cccccaacag	1080
cctccagaga	cgCGGccca	gtga				1104

<210> 17
 <211> 3939
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 2902460CB1

<400> 17						
ccgcagtgtg	ctggaaggc	agctgcggca	gtagcgtgag	cagcccaagt	tgggctggtc	60
gcctgcgagg	ggaccggcag	caggtgggtg	cagcccggtac	cctctccccg	ccaggccgga	120
ggaggccaag	aggaagctgc	ggatcttgca	gcgagagtgt	cagaacgtgc	aggtgaacca	180
gaaagtgggc	atgtttgagg	cgcacatcca	ggcacagagc	tccgccattc	aagcgcctcc	240
cagcccgctg	ttggcaggc	ctcgctcgcc	ctccccgtgc	cccttcgca	gcacagctca	300
gccccctgga	agggctcctg	ttcagggcgc	ccggagcgag	gaacggagga	caaagtctct	360
gggggagcaa	tgtccagaga	cttcaggaac	cgactccggg	aggaaggag	ggcccagcct	420
atgctctctg	caggtgaaga	aaggaatgcc	acctcttccc	ggccgggctg	cccctacagg	480
atcagagctc	cagggctccat	ccgcttttgt	aaggatggag	aagggtatcc	ctgccagctc	540
ccgctgtggc	tcacccacag	ctatggaaat	tgacaaaagg	ggctctccta	ccccgggaac	600
toggagctgc	ctagctccct	catggggctc	gttcggagct	agcttaacga	tggccacgga	660
agtggcagcg	agagttacat	ccactgggcc	acaccgtcca	caggatcttg	ccctcactga	720
gccgtctggg	agagccctg	agcttgagga	cctgcagccc	ccagaggccc	tgggtggagag	780
gcaggggcag	ttctctggca	gtgagacaag	cccagcccca	gaaagggcgc	ggccccgcga	840
tggagaaccc	ctgggaaaga	tggggaaagg	atatctgccc	tgtggcatgc	cgggctctgg	900
ggagcctgaa	gtgggcaaaa	ggccagagga	gacgactgtg	agcgtgcaaa	gcgcagagtc	960
ctctgatgcc	ctgagctggt	ccaggtcgcc	cagggccctg	gcctccgtag	gcccctgagga	1020
ggcccgaagt	ggggcccccg	tgggcggggg	gcgttggcag	ctctccgaca	gagtgagggg	1080
agggctcccc	acgctgggct	tgcttggggg	cagcccccca	gcacagccgg	ggaccgggaa	1140
tgtggaggcg	ggaattcctt	ctggcagaat	gctggagcct	ttgccctggt	gggacgctgc	1200
gaaagatctg	aaagaacctc	agtgcctctc	tggggacagg	gtgggtgtgc	agcctgggaa	1260
ctccaggggt	tggcagggca	ccatggagaa	agccggtttg	gcttggacgc	gtggcacagg	1320
ggtgcaatca	gaggggactt	gggaaagcca	gcggcaggac	agtgatgcc	tcccagctcc	1380
ggagctgcta	ccccaaagtc	aggacaagcc	tttctctgag	aaggcctgca	gccccagcaa	1440
catacctgct	gtcatcatta	cagacatggg	cacccaggag	gatggggcct	tggaggagac	1500
gcagggaaag	cctcggggca	acctgcccct	gagggaaact	tctcttctct	cgccctctct	1560
cacgggcttc	tcctcctctc	acgaagctc	agaggaggac	atctccagtg	acctgagcgc	1620
caccctggac	cccaactcag	ccttctgca	tacctggac	cagcagaaac	ctagagtggg	1680
caaatcatgg	aggaagataa	aaaacatggt	gcactggtct	cccttcgtca	tgctcttcaa	1740
gaagaagtac	ccttgatcc	agctggcagg	acacgcaggg	agtttcaagg	cagctgcccc	1800
tggcaggatc	ctgaagaagc	actgtgagtc	agagcagcgc	tgccctggacc	ggctgatggt	1860
ggatgtgctg	aggcccttcg	tacctgctca	ccatggggat	gtggtgaagg	acggggagcg	1920
ctacaaccag	atggacgacc	tgctggccga	cttcgactcg	ccctgtgtga	tggactgcaa	1980
gatgggaatc	aggacctacc	tggaggagga	gctcacgaa	gcccgggaga	agcccagcct	2040
gcggaaggac	atgtaccaga	agatgatcga	ggtggacccc	gaggccccca	ccgaggagga	2100
aaaagcacag	cgggctgtga	ccaagccacg	gtacatgcag	tggcgggaga	ccatcagctc	2160
cacggccacc	ctggggttca	ggatcagagg	aatcaagaaa	gaagacggca	ccgtgaaccg	2220
ggacttcaag	aagaccaaaa	cgagggagca	ggtcacccag	gccttcagag	agttcactaa	2280
aggaaacct	aacatcctga	tcgctatcg	ggaccggctg	aaggccattc	gaaccactct	2340
agaagttct	cccttcttca	agtgccacga	ggtcattggc	agctccctcc	tcttcatcca	2400
cgacaagaag	gaacaggcca	aagtgtggat	gatcgacttt	gggaaaacca	cgcccctgcc	2460
tgagggccag	acctgcagc	atgacgtccc	ctggcaggag	gggaaccggg	aggatggcta	2520

```

cctctcgggg ctcaataacc tcgtcgacat cctgaccgag atgtcccagg atgccccact 2580
cgctgagct gcccacgccc tccttgccc ccgctgggc ctcctttcct cctcctgtgc 2640
ttcctttctc gttcctaact ttcccttca cttacacctga ctgacctcc tgaactgcac 2700
tacaagacac tttgtagaag aggagatgag agtttctagt cattttccta acttcagggc 2760
ttggaggtgg tgtttgcact gctttttgta gagagggtea cctactagaa gagaaatgcc 2820
cagtcttaga ggtgggtcag gtgtagagct ggagggggtc cctggctgct gaggggaccc 2880
taccagatga gccctgcctc tgggagcccc ctaggaagca ccagcctgga cctaccacct 2940
gcgaggcct gctgccccct ggcgccagc gctgttagag tgctgccaag cacagcctta 3000
ttctgcccgg gccctcccc aoggagagcc cagggggccg gccgggttcc tgggtccctgg 3060
ctgggagcag ggcctttctg tagttggggc acaaaaccat cggggaacca catgttgact 3120
gtgagcaaa tgcttccga ttagcagcct cagggatgcc ctggtggcct cccagggct 3180
gctcaggcaa ggccccccac ccatctggta tggaaacctg ccggctccag gccagacca 3240
ggagccaaga gaagctgaa gccagcttgg ctgtgttctc tgatctaggc cttcccagag 3300
gagcgagca gaagctgtgc cacttggaa tgcaaccoat gagttcagaa ggcacctct 3360
gcatgctga gctccaaggg tgctaccagg ggaagatggg atctatagag tctctgggcc 3420
ctggccccag gtaggagcac atttttctg acctcacct acctgggtct agttgtgcaa 3480
ccctgacctg atacatgggc tctgtcatg gggcccagag tcccttgcag atatgaaat 3540
aggggaggag ctcaggtctg ccgacggcag gaagaaggca ggctctggc ttcagaggt 3600
gocgcggtgg cctcctggca tcatattgta ttgctctga aacaagcctt actgcttggg 3660
ggccttagat tctgcttct ccaatgtagt gtgggtatct tgtagggtat gtgggtgagc 3720
ccagggcgtg ctccaggcac ccttctctga agtctctgca tttggagatt cgtggagaac 3780
ctatttaagc ccaattttaa ctgaaagcca gtgagtctga tatggaaggg aatgtaaaat 3840
ttgctgact tcttaagaac aaaaccccc gctctgtgcc ccatgtctct tggggcttgc 3900
cacccactcc tttgctgtca gaggtacagg agctgggag 3939

```

```

<210> 18
<211> 1381
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 6383934CB1

```

```

<400> 18
atgaggacaa tgctctgtgg cccacatgac ggggggatgt agacggcagc gggccagtc 60
gctcctggca ccatggacga tgccacagtc ctaaggaaga agggttacat cgtaggcatc 120
aatcttggca agggttccta cgcaaaagtc aaatctgcct actctgagcg cctcaagttc 180
aatgtggctg tcaagatcat cgaccgcaag aaaacacctc ctgactttgt ggagagattc 240
ttcctcggg agatggacat cctggcaact gtcaaccacg gctccatcat caagacttac 300
gagatctttg agacctctga cggacggatc tacatcatea tggagcttgg cgtccagggc 360
gacctcctcg agttcatcaa gtgccaggga gccctgcctg aggaactggc acgcaagatg 420
ttcgcagacg tctcctccgc cgtcaagtac tgccacgacc tggacatcgt ccaccgggac 480
ctcaagtgcg agaaccttct cctcgacaag gacttcaaca tcaagctgtc tgactttggc 540
ttctccaagc gctgcctgcg ggacagcaat gggcgcatca tctcagcaa gaccttctgc 600
gggtcggcag catatgcagc ccccgaggtg ctgcagagca tccctacca gcccaaggtg 660
tatgacatct ggagcctagg cgtgatctc tacatcatgg tctgoggctc catgccttac 720
gacgactccg acatcaagaa gatgctcgt atccagaagg agcaccgct caacttcca 780
cgtccaagc acctgacctg cgagtgaag gacctcatc accaatgct gcagcccagc 840
gtcagccagc ggctccacat cgatgagatc ctacagcact cgtggctgca gcccccaag 900
cccaagcca cgtctctgct cctctcaag agggaggggg agggcaagta ccgcctgag 960
tgcaaaactg acaccaagac aggcttggag ccgaccacc ggcccagca caagcttggg 1020
gcaaaaacc agcacggct gctgggtgtg ccgagaacg agaacaggat ggaggacagg 1080
ctggccgaga cctcaggggc caaagacctc cacatctccg gactgaggt ggggaaagca 1140
agcacctagc atgacaatgg ccccgttgtg tgtgggtggg gtcggggttg gggggcatgg 1200
tgagctcggc cttcacgtaa actaagtagg caggtaggat ctgaagaagg cacaggtgca 1260
agtaaaatc gtcaattaaa ccaactatct gattacgttc cattagcttt cttccactta 1320
gcagcaaaag cgttccttac tgaccaccaa ataaaccaca ggggtgtgtg aagcatcaaa 1380
a 1381

```

```

<210> 19
<211> 3904
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature

```

<223> Incyte ID No: 3210906CB1

<400> 19

tattcggggt	tcagaccoca	caatcagaaa	tccggaattc	ggcagctgtc	gcctcagacg	60
agggggagga	ctggaccgcg	aggtcagatt	aggttgtcac	cccctcccct	ccaggggag	120
cttcccgggc	ccgcccctca	ggaaggcgga	aagccgagga	agagggtgca	aggggaaagg	180
tctccttgcc	cctctccctg	acttggcaga	gccgctggag	gaccccaggc	ggaagcggag	240
gcgctggggc	accatagtga	cccctaccag	gccaggcccc	actctcaggg	ccccagggg	300
ccaccatgcc	agctgggggc	cgggcccggga	gcctgaagga	cccagatgtg	gctgagctct	360
tcttcaagga	tgaccagaa	aagctcttct	ctgacctccg	ggaaattggc	catggcagct	420
ttggagccgt	atactttgcc	cgggatgtcc	ggaatagtga	ggtgggtggcc	atcaagaaga	480
tgtcctacag	tgggaagcag	tccaatgaga	aatggcaaga	catcatcaag	gaggtgcggt	540
tcttacagaa	gctccggcat	cccaacacca	ttcagtaccc	gggctgttac	ctgagggagc	600
acacggcctg	gctggtaatg	gagtattgcc	tgggctcaac	ttctgacctt	ctagaagtgc	660
acaagaaacc	ccttcaggag	gtagagatcg	cagctgtgac	ccacggggcg	cttcaggggc	720
tggcatatct	gcactcccac	aacatgatcc	atagggatgt	gaaggctgga	aacatcctgc	780
tgtcagagcc	agggtagtgg	aagctagggg	actttggttc	tgcgctccatc	atggcacctg	840
ccaactcctt	cgtgggcacc	ccatactgga	tggcaccoga	ggtgatcctg	gccatggatg	900
aggggcagta	cgatggcaaa	gtggacgtct	ggtccttggg	gataacctgc	atcgagctgg	960
ctgaacggaa	accaccgctc	ttaacatga	atgcgatgag	tgccctatac	cacattgcac	1020
agaaacgaatc	ccccgtgctc	cagtcaggac	actggctctga	gtacttccgg	aattttgtcg	1080
actcctgtct	tcagaaaatc	cctcaagaca	gaccaacctc	agagggtctc	ctgaagcacc	1140
gctttgtgct	ccgggagcgg	ccacccacag	tcacatgga	cctgatccag	aggaccaagg	1200
atgccgctgc	ggagctggac	agcctgcagt	accgcaagat	gaagaagatc	ctggtccaag	1260
aggcacccaa	cggccctggt	gccgagggcc	cagaggagga	agaggaggcc	gagccctaca	1320
tgcaactgct	cgggactctg	accagcctcg	agagttagcca	ctcagtgccc	agcatgtcca	1380
tcagcggctc	cagccagagc	agctccgtca	acagctagc	agatgcctca	gacaacggag	1440
aagaggagga	ggaggaggag	gaagaggagg	aggaggaaga	aggccctgaa	gcccgggaga	1500
tggccatgat	gcaggagggg	gagcacacag	tcacctctca	cagctccatt	atcccaccgc	1560
tgcggggctc	tgacaaccta	ctaccagcc	agagataaac	agagataaac	cccagcctc	1620
tccagcggcc	tgagcaccca	gctcccactt	ccaccacctc	ttccgcccgc	cgccgggctc	1680
actgccgtaa	ccgagaccac	tttgccacca	tcggaaccgc	ctcccctggtc	agccgctcaga	1740
tccaggagca	tgagcaggac	tctgcgctgc	gggagcagct	gagcggctat	aagcggatgc	1800
gacgacgca	ccagaagcag	ctgctggccc	tggagtcaag	gctgaggggt	gaacgggag	1860
agcacagtgc	acggctgcag	cgggagcttg	aggcgcagcg	ggctggcttt	ggggcagagg	1920
cagaaaaagc	ggcccggcgg	caccagggca	taggtgagaa	ggaggcacga	gctgcccagg	1980
ccgaggagct	gaagtccag	cagcacatcc	ttgggcagca	gaagaaggag	ctggctgccc	2040
tgctggaggc	acagaagcgg	acctacaaac	ttcgcaagga	acagctgaag	gaggagctcc	2100
aggagaaccc	cagcactccc	aagcgggaga	aggccgagtg	gctgtctcgg	cagaaggagc	2160
agctccagca	gtgcccaggc	gaggaggaag	caggctgctc	gcggcggcag	cgccagctct	2220
ttgagctgca	gtgtccggag	tacaagcgca	agatgttget	ggctcggcac	agcctggacc	2280
aggactgtct	gcggyaggac	ctgaacaaga	agcagaccca	gaaggacttg	gagtggtcac	2340
tgctgctctg	ggcagcagag	gccacgcggg	agctggagct	gcggcagctc	caggccctgc	2400
agcgcacgcy	ggctgagctc	accgcctgca	agcaccagac	ggagctgggg	aaccagctgg	2460
agtacaacaa	gcggcgtgag	caagagttgc	ggcagaagca	tgccggcccag	gttcggccagc	2520
agcccaagag	cctcaaatct	aaggagctgc	agatcaagaa	gcagttccag	gagacgtgta	2580
ctcagcacia	gagcctcctt	aagcggctca	aggaagagca	gacccgcaag	ctggcgatct	2700
tgccggagca	gtatgaccag	tccatctcag	agatgctcag	ctcacaggcg	ctgcggcttg	2760
atgagaccca	ggaggcagag	ttccagccc	ttcggcagca	gcttcaacag	gagctggagc	2820
tgctcaacgc	ttaccagagc	aagatcaaga	tcggcacaga	gagccagcac	gagagggagc	2880
tgccggagct	ggagcagagg	gtcgcgctgc	ggcgggcact	gctggagcag	cgggtggaag	2940
aggagctgct	ggccctgcag	acaggacgct	ccgagcgaat	ccgagctctg	cttgagcggc	3000
aggcccgtga	gatcagggcc	ttcagatcgg	aaagcatgag	gctgggcttc	tccagcatgg	3060
ctctgggggg	catcccggct	gaagctgctg	cccagggcta	tcctgtctca	ccccctgccc	3120
cagcctggcc	ctcccgtccc	gttcccgttt	ctggggcaca	ctggagccat	ggccctctc	3180
caccaggcat	gcccctcca	agcctgctct	agcctgctct	gctggctccc	ccaggccccc	3240
caaaactggct	ggggcccccc	acacaaagtg	ggacaccccg	tggcggagcc	ctgctgctgc	3300
taagaaacag	ccccagccc	ctgcggcggg	cagcctcggg	gggcagtgcc	agtgagaaatg	3360
tgggcccccc	tgctgcggcg	gtgcccgggc	ccctgagccc	cagcacccag	gtcgtctccc	3420
acatcctcaa	tgggtctctc	cacttctatt	cctgaggtgc	agcggggagg	agcagatgag	3480
ctgggcaggg	caggggtggg	tggagcctga	ccctggaggg	cactgagctg	gagggcccctg	3540
caagggtagg	ggacaagatg	taggtcccag	ctcccctcag	acctcctcat	ctcatgagct	3600
tcttggggct	ggccagtgcc	ccagggccag	cttggcgata	gatgcctcaa	ggctgcctgg	3660
gagccccgcc	tccctaccat	ggtgcccagg	gtctccctcc	gccacctagg	aaaggaggga	3720
gatgtgctg	tcaaatatct	atctagtccc	ctggggggag	ggaagggtgg	gtctagacat	3780
actatattca	gagaactata	ctaccctcac	agtgaggccc	tcagacctgc	cacagggcag	3840

agcaggctctg gggcctgagg cagggagaat gagaggccac ttactggcag gaaggatcag 3900
gatg 3904

<210> 20
<211> 1987
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3339024CB1

<400> 20
gaagaacct gaggaacaga cttacctcag caacctggc acctccaacc cgacacatgc 60
tactgctgct gctactgctg ccaccctgct tctgtgggag agtgggggct aaggaacaga 120
aggattacct gctgacaatg tagaagtccg tgacgggtgca ggagggcctg tgtgtctctg 180
tgctttgctc cttctcctac ccccaaaatg gctggactgc ctccgatcca gttcatggct 240
actggttccg ggcaggggac catgtaagcc ggaacattcc agtggccaca aacaaccag 300
ctcgagcagt gcaggaggag actcgggacc gattccacct cctgggggac ccacagaaca 360
aggattgtac cctgagcctc agagacacca gagagagtga tgcagggaca tacgtctttt 420
gtgtagagag aggaatatg aaatggaatt ataaatatga ccagctctct gtgaatgtga 480
cagcgtccca ggacctact tcaagataca ggctggaggt gccagagtgc gtgactgtgc 540
aggagggtct gtgtgtctct gtgcccctgca gtgtccctta cccocattac aactggactg 600
cctctagccc tgtttatgga tcctgggttca aggaaggggc cgatatacca tgggatattc 660
cagtggccac aaacacccca agtggaaaag tgcaagagga taccacaggt cgattctctc 720
tccttgggga cccacagacc aacaactgct cctgagcat cagagatgcc aggaaggggg 780
atccaggaaa gtactacttc cagggtggaga gaggaagcag gaaatggaac tacatatatg 840
acaagctctc tgtgcatgtg acagccctga ctacatgcc caocttctcc atccccggga 900
ccctggagtc tggccacccc aggaacctga cctgctctgt gccctgggccc tgtgaacagg 960
ggagccccc caccgatcacc tggatggggg cctccgtgtc ctccctggac cccactatca 1020
ctcgctctcc gatgctcagc ctcatcccac agccccagga ccatggcacc agcctcact 1080
gtcagggtgac cttgacctgg gccggcgtga ccatgaccag ggctgtccga ctcaacatat 1140
cctatctctc tcagaacttg acctgactgc tcttccaagg agatggcaca gcatccaaa 1200
ccttgggaa tggtcggcc ctttcagtcc tggagggcca gtcctgcac cttgtctgtg 1260
ctgtcgacag caatccccct gccaggctga gctggacctg ggggagcctg accctgagcc 1320
cctcacagtc ctccaacctt ggggtgctgg agctgcctcg agtgcattgt aaggatgaa 1380
gggaattcac ctgccagctc cagaacctc taggtccca gcacattcc ctgagcctct 1440
ccctgcaaaa caggtacaca ggcaaatga ggcctatatc aggagtgacg ctaggggcat 1500
tcgggggagc tggagccaca gccctggtct tctgtactt ctgcatcctc ttcgtttag 1560
tgaggtctct caggaagaaa tcggcaaggg cagcagtggg cgtgggggat acaggcatgg 1620
aggacgcaaa cgtgtctggt ggctcagcct ctcaaggacc cctgatgaa tccccggcag 1680
atgacagccc cccacaccat gctccgccag ccctggccac cccctccca gaggaaggag 1740
agatccagta tgcacccctc agcttccaca aagcgaggcc tcagtaccca caggaacagg 1800
aggccatcgg ctatgagtac tccagatca acatccccaa gtgagaaact gcagagactc 1860
aggcctgttt gagggctcac gacccctcca gcaaagaagc ccgagactga ttcctttaga 1920
attaaaagcc ctccatgctg tgcaacgggg gatccactag ttaagagcgg cgcaccocgg 1980
tgccct 1987

<210> 21
<211> 3925
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4436929CB1

<400> 21
cgtcctcga ggcaggaga gtaccgggccc ggcccggctg ccgcccaggg agcgcggctg 60
gcccctggt ctgcccgtga gatacacaga ggcagagaga cattattgt tatttgttt 120
ttggtggcaa aaagggaaaa tggcgaacga ctcccctgca aaaagtctgg tggacatcga 180
cctctcctcc ctgcccgatc ctgctgggat ttttgagctg gtggaagtgg ttggaatgg 240
cacctatgga caagtctata agggctcgaca tgttaaaacg ggtcagtgg cagccatcaa 300
agttatggat gtcactgagg atgaagagga agaaatcaaa ctggagataa atatgctaaa 360
gaaatactct catcacagaa acattgcaac atattatggt gctttcatca aaaagagccc 420
tccaggacat gatgaccaac tctggcttgt tatggagttc tgtggggctg ggtccattac 480
agaccttgtg aagaacacca aaggaacac actcaagaa gactggatcg cttacatctc 540

cagagaaatc	ctgaggggac	tggcacatct	tcacattcat	catgtgattc	accgggatat	600
caaggggccag	aatgtgttgc	tgactgagaa	tgacagaggtg	aaacttgttg	actttgggtg	660
gagtgctcag	ctggacagga	ctgtggggcg	gagaaatcacg	ttcatagga	ctccctactg	720
gatggctcct	gaggtcatcg	cctgtgatga	gaaccacagat	gccacctatg	attacagaag	780
tgatctttgg	tcttgtggca	ttacagccat	tgagatggca	gaaggtgctc	ccccctctctg	840
tgacatgcat	ccaatgagag	cactgtttct	cattcccaga	aaccctcctc	ccccggctgaa	900
gtcaaaaaaa	tggtcgaaga	agtttttttag	ttttatagaa	gggtgcctgy	tgaagaatta	960
catgcagcgg	ccctctacag	agcagctttt	gaaacatcct	tttataaggg	atcagccaaa	1020
tgaaggcga	gttagaatcc	agcttaagga	tcatatagat	cgtaccagga	agaagagagc	1080
cgagaagat	gaaactgagt	atgagtacag	tgggagtgg	gaagaagagg	aggaagtggc	1140
tgaacaggaa	ggagagccaa	gttccattgt	gaacgtgcct	ggtgagtcta	ctcttcgccg	1200
agatttctctg	agactgcagc	aggagaacaa	ggaacgttcc	gaggctcttc	ggagacaaca	1260
gttactacag	gagcaacagc	tccgggagca	ggaagaatat	aaaaggcaac	tgctggcaga	1320
gagacagaag	cggattgagc	agcagaaaaga	acagagccga	cggctagaag	agcaacaaag	1380
gagagagcgg	gaagctagaa	ggcagcagga	acgtgaacag	cgaaggagag	aacaagaaga	1440
aaagagcgt	ctagaggagt	tggagagaag	gcgcaagaa	gaagaggaga	ggagacgggc	1500
agaagagaa	aagagagag	ttgaagagaga	acaggagtat	atcaggcgac	agctagaaga	1560
ggagcagcgg	cacttggag	tccttcagca	gcagctgctc	caggagcagg	ccatgttact	1620
gcatgaccat	aggaggccgc	accgcagca	ctcgcagcag	ccgccaccac	cgagcagga	1680
aaggagcaag	ccaagcttcc	atgctcccga	gccccaaagcc	cactacgagc	ctgctgaccg	1740
agcgcgagag	gtggaagata	gatttaggaa	aactaaccac	agctcccctg	aagcccagtc	1800
taagcagaca	ggcagagtat	tggagccacc	agtgccttcc	cgatcagagt	ctttttccaa	1860
tggcaactcc	gagctgtg	atcccgcctc	gcagagacca	gcggagccac	aggttctctg	1920
gagaacaaca	tctcgctccc	ctgttctgtc	ccgtcagagat	tccccactgc	agggcagttg	1980
gcagcagaat	agccaggcag	gacagagaaa	ctccaccagc	agtattgagc	ccaggcttct	2040
gtgggagaga	gtgggagaagc	tgggtcccag	acctggcagt	ggcagctcct	cagggtccag	2100
caactcagga	tcccagcccg	ggtctcacc	tgggtctcag	agtggctccg	gggaacctg	2160
cagagtggaga	tcattcatcca	agctcgaagg	ctctccatct	cagcgcctgg	aaaatgcagt	2220
gaaaaaacct	gaagataaaa	aggaagtttt	cagaccctc	aagcctgtcg	gcgaagtggg	2280
tctgaccgca	ctggccaaag	agcttcgagc	agtggaaagat	gtacggccac	ctcaaaagt	2340
aacggactac	tcctcatcca	gtgaggagtc	ggggaccgacg	gatgaggagg	acgacgatgt	2400
ggagcaggaa	ggggctgacg	agttccacctc	aggaccagag	gacaccagag	cagcgtcatc	2460
tctgaatttg	agcaatggtg	aaacggaatc	tgtgaaaacc	atgattgtcc	atgatgatgt	2520
agaagagtgag	cggccatga	cccacccaa	ggagggcact	ctaactcgtcc	gccagactca	2580
gtccgctagt	agcacactcc	agaaacacaa	atcttctctcc	tcctttacac	cttttataga	2640
ccccagatta	ctacagattt	ctccatctag	cggaacaaca	gtgacatctg	tgggtgggatt	2700
ttcctgtgat	gggatgagac	cagaagccat	aaggcaagat	cctaccggga	aaggctcagt	2760
ggtcaatgtg	aatcctacca	acactaggcc	acagagtgc	accccggaga	ttcgtaaata	2820
caagaagagg	tttaactctg	agattctgtg	tgctgcctta	tggggagtg	atgtgctagt	2880
gggtacagag	agtggcctga	tgctgctgga	cagaagtggc	caaggggaagg	tctatcctct	2940
tatcaaccga	agacgatttc	aacaaatgga	cgtacttgag	ggcttgaatg	tcttggtgac	3000
aatactctggc	aaaaaggata	agttacgtgt	ctactatttg	tcctygttaa	gaaataaaat	3060
acttcacaat	gatccagaag	ttgagaagaa	gcagggatgg	acaaccgtag	gggatttggg	3120
aggatgtgta	cattataaag	ttgtaaaata	tgaagaatc	aaatttctgy	tgattgcttt	3180
gaagagttct	gtggaagtct	atgctgtggc	accaaagcca	tatcacaat	ttatggcctt	3240
taagtcaatt	ggagaattgg	tacataagcc	attactgggtg	gatctcactg	ttgaggaagg	3300
ccagaggttg	aaagtgatct	atggatcctg	tgctggattc	catgctgttg	atgtggattc	3360
aggatcagtc	tatgacattt	atctaccaac	acatatccag	tgtagcatca	aaccctatgc	3420
aatcatcatc	ctccccaaata	cagatggaat	ggagcttctg	gtgtgctatg	aagatgaggg	3480
ggtttatgta	aacacatatg	gaaggatcac	caaggatgta	gttctacagt	ggggagagat	3540
gcctacatca	gtagcatata	ttcgatccaa	tcagacaatg	ggctggggag	agaaggccat	3600
agagatocga	tctgtgaaa	ctggtcactt	ggatggtgtg	ttcatgcaca	aaagggctca	3660
aagactaaaa	ttctgtgtg	aacgcaatga	caaggtgttc	tttgctctg	ttcggctg	3720
tggcagcagt	caggtttatt	tcattgacctt	aggcaggact	tctcttctga	gctggttagaa	3780
gcagtgtgat	ccagggatta	ctggtcctca	gagtcctcaa	gatcctgaga	acttgggaatt	3840
ccttgttaact	ggagctcgga	gctgcaccga	gggcaaccag	gacagctgtg	tgtgcagacc	3900
tcattgtgtg	ggttctctcc	ctctc				3925

<210> 22
 <211> 1210
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5046791CB1

```

<400> 22
ttacagggtca tctaccoccta taccocacaa aatgacgatg agctggagct ggtccccggg 60
gacttcacatc tcatgtctcc aatggagcag accagcacca gcgagggttg gatctatggc 120
acgtccttaa ccaccggctg ctctggactc ctctgagaa ttacatlacc aaggctgatg 180
aatgcagcac ctggatattt catggttctt attcaatctt aaatacatcg tcatccaact 240
ctctcacgtt tggggatgga gtattggaga gccggcctta tgaggaccag gggctcgggg 300
agacgactcc tcttactatc atctgccagc ccatgcagcc gctgagggtc aacagccagc 360
ccggccocca gaagcgatgc cttttttgtg gtccgcatgg tgagaggatg gatgtttgt 420
ttgggaagta ctggctgtcc cagtgtctcg atgccaaagg ccgctacata cgcaccaacc 480
tgaacatgcc tcatagttta cctcagcggg gtggtggttt ccgagattac gagaaagatg 540
ctcccatcac tgtgtttgga tgcattgcaag caagactagt ggggtgaagcc ttattagaga 600
gcaataccat tatcgatcat gtctattgct ccccgctcc tgcgtcgtt cagactgcac 660
acaatatctt gaaaggttta caacaagaaa atcacttgaa gatecgtgta gagccccggt 720
tatttgatg gacaaaatgg gttgctggga gcacattacc tgcattggata cctccatcag 780
agttagctg agccaacctg agtgytgata caacctacag acctcacatt ccaatcagca 840
aattagttgt ttcagaatcc tatgatactt atatcagtag aagtttccaa gtaacaaaag 900
aaataataag tgaatgtaaa agtaaaggaa ataacatcct gattgtggcc cacgcatctt 960
cccttgaagc gtgtacctgc caacttcagg gctgtcacc tcagaactcc aaggactctg 1020
tacaatggt ccgaaagatc ccatatctgg gattttgttc ctgtgaagaa ttaggagaaa 1080
ctggaatatg gcagctgaca gatccaccaa tccttctct taccatgga ccaactgggg 1140
gcttcaactg gagagagacc ttgcttcaag aataaacat accagtgaac aagaaggaaa 1200
aaaaaaaaa 1210

```

```

<210> 23
<211> 1521
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1416174CB1

```

```

<400> 23
ggcacgggtc tgggctcgc cacactgcac acctaccgcg gacgcctctc ctacctcccc 60
gccactgtgg aacctgcctc gccaccocct gccatagcc tgcctcgtgc caagtoggag 120
ctgaccctaa ccccagacc cccccgcct atggcccact caccctgca tcgttctgtg 180
tctgacctgc ctctccctt gccccagcct gccctggcct ctcttggctc ccagaacc 240
ctgcccctcc tgtccctcaa cgggtggggc ccagagctgg ctggggactg ggggtgggct 300
ggggatgctc cgctgtcccc ggaccactg ctgtcttcc ctcttggctc tcccaaggca 360
gctctacact caccgtctc cgaagggccc ccgtaattcc cccatctctt gggctcccac 420
ttccaccctc tgatccccg gttagggcct ccacctgccc ccgcccagc cactcgtgc 480
ctccgctggg caccocgtg cccccagact ggttgacct ggagggggac ttgtgtctca 540
tgttggccat ctgcccagc cacctaggcg ctgacctggt ggcagctccg catggcgcct 600
tcgacgacgg cctggtgcac ctgtgctggg tgcgtacggg catctcggg gctgcgctgc 660
tgcgctttt cttggccatg gagcgtggtg gccacttcag cctgggctgt ccgagctgg 720
getacgccgc ggcccgtgcc ttccgcctag agccgctcac accacgccc gtgctcacag 780
tggacgggga gcaggtggag tatggccgc tacaggcaca gatgcacct gccatcggta 840
cactgctcac tgggctcct ggctgcccgg ggcgggagcc ctgaaactaa acaagcttgg 900
taccgcocgg gggcggggcc tacattccaa tggggcggag ctgagctagg ggggtgtggc 960
tggctgctag agttgtggtg gcaggggccc tggcccctc tcaggatgc gctcgtcttc 1020
atgggaccag acgtgatgct ggaagggtgg cgtcgtcac gttaaagaga aatgggctcg 1080
tcccaggggt agtgctgat caatgaggc ggggcctggc gtctgatctg gggccgccc 1140
tacggggcag ggctcagtc tgacgcttgc cacctgctcc taccggcca ggatggctga 1200
gggocggagc tattttacgc gtocccaat gacaggacct ggaatgtact ggctgggta 1260
ggcctcagtg agtcggccgg tcagggccc cagcctcgcc ccatccactc cgggtgcctc 1320
athtagctgg ccaatcagcc caggaggggc aggttcccc gggccggcgc taggatttgc 1380
actaatgttc ctctccccgc ggtgggggc ggggaaattc atatcccctg ttcgtctcat 1440
gcgctctc cgtcccaat ctaaaaagca attgaaaagg tctatgcaat aaaggcagtc 1500
gcttcattcc tctcaaaaa a 1521

```

```

<210> 24
<211> 1640
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature

```

<223> Incyte ID No: 3244919CB1

<400> 24

```

gcagcgccgc ggcgtcccc ggctcgccgc cccccggccg cgcgcgcccc gccggctccg 60
acgcgccttc ggcoctgccg ccgcccgtg ctggccagcc cggggcccgg gactcggggc 120
atgtccgctc gcagccgcgc cccctgtttc agtggagcaa gtggaagaag aggatgggct 180
cgtccatgtc ggcggccacc gcgcggaggc cgggtgttga cgacaaggag gacgtgaact 240
tcgaccactt ccagatcctt cgggccattg ggaagggcag ctttggcaag gtgtgcattg 300
tcgagaagcg ggacacggag aagatgtacg ccatgaagta catgaacaag cagcagtgca 360
tcgagcgcga cgaggtccgc aacgtcttcc gggagctgga gatcctgcag gagatcgagc 420
acgtcttctt ggtgaacctc tggtaactct tccaggacga ggaggacatg ttcattgctg 480
tggacctgct actggggcggg gacctgcgct accacctgca gcagaacgtg cagttctccg 540
aggacacggg gaggctgtac atctgcgaga tggcactggc tctggactac ctggcgggcc 600
agcacatcat ccacagagat gtcaagcctg acaacattct cctggatgag agaggacatg 660
cacacctgac cgacttcaac attgccacca tcatcaagga cggggagcgg gcgacggcat 720
tagcaggcac caagccgtac atggctccgg agatcttcca ctctttgtc aacggcggga 780
ccggctactc cttcgagggtg gactggtggt cgggtgggggt gatggcctat gagctgctgc 840
gaggatggag gccctatgac atccactcca gcaacgccgt ggagtccttg gtgcagctgt 900
tcagcacctg gagcgtccag tatgtcccca cgtggtccaa ggagatggtg gccttgctgc 960
ggaagctcct cactgtgaac cccgagcacc ggctctccag cctccaggac gtgcaggcag 1020
ccccggcgtt ggccggcgtg ctgtgggacc acctgagcga gaagaggggtg gagccgggct 1080
tcgtgcccaa caaaggccgt ctgcaactgcg accccacctt tgagctggag gagatgatcc 1140
tggagtccag gccctgcac aagaagaaga agcgcctggc caagaacaag tcccgggaca 1200
acagcaggga cagctcccag tccgcccacc ggagcaagtc caagccatcc acccagaggc 1260
aagggagctg ggccctggca tcctcggggt tgggagaatg actatcttca agactgcctc 1320
gatgccatcc agcaagactt cgtgattttt aacagagaaa agctgaagag gagccaggac 1380
ctcccagggg agcctctccc cgcacctgag tccagggatg ctgcggagcc tgtggaggac 1440
gagggcgaac gctccgccct gcccatgtgc ggccccattt gccctcggc cgggagcggc 1500
taggcgggga cgcctgtggt cctcaccctt tgagctgctt tggagactcg gctgccagag 1560
ggagggccat gggccgaggc ctggcattca cgttcccacc cagcctggct ggcggtgcc 1620
acagtgcctc ggacacattt

```


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: onal Application No
PCT/US 00/35304

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	DATABASE EMBL [Online] human chromosome 2 clone RP11-88L24, 14 February 2000 (2000-02-14) WATERSTON: Database accession no. AC023270 XP002161690 the whole document ---	1-4,6,7, 11,12
P,X	DATABASE EMBL human EST, 15 December 2000 (2000-12-15) STRAUSBERG: Database accession no. BF576072 XP002161691 the whole document ---	1,3,6,7, 11,12
E	WO 00 58473 A (CURAGEN CORP ; LEACH MARTIN (US); SHIMKETS RICHARD A (US)) 5 October 2000 (2000-10-05) Sequence ID NO: 791 and 792 -----	1,3, 6-14,16, 18,25, 26,28

7

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/35304

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, 23-24
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:

see additional sheet

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.:
1-19, 22, 25-28 (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

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

1. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

An isolated polypeptide comprising an amino acid consisting of SEQ ID NO:1, an isolated polynucleotide encoding said polypeptide, an isolated polynucleotide comprising a sequence consisting of SEQ ID NO:13, said polynucleotides in a cell or in an organism and methods of recombinant production of said polypeptide. Methods of detection of said polynucleotides, pharmaceutical composition comprising said polypeptide, method of treating a PKIN-related disease by administering said composition. Methods of screening compounds for binding to or for effectiveness as agonists or antagonists of said polypeptide. Method of screening a compound for altering expression of said polynucleotide. Method of assessing toxicity of a test compound on said polypeptide.

2. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:2, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:14.

3. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:3, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:15.

4. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:4, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:16.

5. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:5, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:17.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

6. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:6, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:18.

7. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:7, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:19.

8. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:8, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:20.

9. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:9, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:21.

10. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:10, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:22.

11. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:11, and to an isolated polynucleotide comprising a

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:23.

12. Claims: 1-19, 22, 25-28 (partially)

As Invention 1 but relating to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence consisting of SEQ ID NO:12, and to an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO:24.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20-21, 23-24

Present claims 20-21 and 23-24 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely having agonist/antagonist activity on the PKIN polypeptide of claim 1. The claims cover all compounds having this characteristic or property. The application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search impossible.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(Information on patent family members)

International Application No
PCT/US 00/35304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0058473 A	05-10-2000	AU 3774500 A	16-10-2000

- (72)発明者 オウ・ヤング、ジャニス
アメリカ合衆国カリフォルニア州94005・
プリズベーン・ゴールドンイーグルレーン
233
- (72)発明者 リュ、デュング・アイナ・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州95123・
サンノゼ・コイドライブ 233
- (72)発明者 レディ、ルーパ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94086・
サニーベイル・#3・ウェストマッキンレ
ーアベニュー 1233
- (72)発明者 ユエ、ヘンリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州94087・
サニーベイル・ルイスアベニュー 826
- (72)発明者 ヤオ、モニック・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州94043・
マウンテンビュー・フレデリックコート
111
- (72)発明者 ラル、プリーティ
アメリカ合衆国カリフォルニア州95054・
サンタクララ・ラスドライブ 2382
- (72)発明者 カーン、ファラ・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94040・
マウンテンビュー・#221・エスケラアベ
ニュー 333

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA34 AA40 BA11 BB50
DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 AA12 BA10 CA04 CA09
DA06 HA14 HA17
4B050 CC03 DD11 LL01 LL03
4B063 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ27
QQ44 QR07 QR32 QR56 QR62
QR67 QR77 QS25 QS34 QX02
QX07
4B065 AA26X AA93Y AB01 BA01
CA29 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA14 AA17 BA01
BA02 BA08 BA23 BA44 CA53
CA56 CA59 CA62 NA05 NA14
ZA362 ZB072 ZB262 ZC332
ZC412
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA41 DA89 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	人类激酶		
公开(公告)号	JP2003517838A	公开(公告)日	2003-06-03
申请号	JP2001546895	申请日	2000-12-20
[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	ヤングジュンミング ボーグンマライアアール バーフォードニール オウヤングジャニス リュデュングアイナエム レディルーパ ユエヘンリー ヤオモニークジー ラルプリーティ カーンファラエイ		
发明人	ヤング、ジュンミング ボーグン、マライア・アール バーフォード、ニール オウ・ヤング、ジャニス リュ、デュング・アイナ・エム レディ、ルーパ ユエ、ヘンリー ヤオ、モニーク・ジー ラル、プリーティ カーン、ファラ・エイ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P3/06 A61P9/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/12 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P3/06 A61P9/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C12N9/1205		
FI分类号	A61K45/00 A61P3/06 A61P9/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.101 A61P43/00.111 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33 /53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA34 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/HA14 4B024/HA17 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063 /QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ27 4B063/QQ44 4B063/QR07 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR67 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063 /QX07 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA14 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084 /BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/CA62 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZC332 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA89 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045 /FA74		
优先权	60/172066 1999-12-23 US 60/176107 2000-01-14 US		

