

(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 - 521876

(P2003 - 521876A)

(43)公表日 平成15年7月22日(2003.7.22)

(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 29/00	4 B 0 2 4
45/00		35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 29/00		37/02	4 B 0 6 4
35/00		C 0 7 K 14/82	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全119数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 594916(P2000 - 594916)

(86)(22)出願日 平成12年1月21日(2000.1.21)

(85)翻訳文提出日 平成13年7月19日(2001.7.19)

(86)国際出願番号 PCT/US00/01565

(87)国際公開番号 W000/043508

(87)国際公開日 平成12年7月27日(2000.7.27)

(31)優先権主張番号 60/183,027

(32)優先日 平成11年1月22日(1999.1.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

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

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌関連タンパク質

(57)【要約】

本発明は、癌関連タンパク質 (CAP) と、CAP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、CAPの発現に関連する疾患の診断または治療方法、予防方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、

a) SEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:3 (SEQ ID NO:2 - 3) からなる一群から選択されたアミノ酸配列、

b) SEQ ID NO:2 - 3からなる一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自然発生のアミノ酸配列、

c) SEQ ID NO:2 - 3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、

またはd) SEQ ID NO:2 - 3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:2 - 3からなる一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1の単離されたポリペプチド。

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

【請求項4】 SEQ ID NO:5 - 6からなる一群から選択された配列を含むことを特徴とする請求項3の単離されたポリヌクレオチド。

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

【請求項6】 請求項5の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項7】 請求項5の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物。

【請求項8】 請求項1のポリペプチドを作製する方法であって、

a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件の下で、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のポリペプチドの製造方法。

【請求項9】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗

体。

【請求項10】 単離されたポリヌクレオチドであって、

- a) SEQ ID NO:5 - 6からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列、
 - b) SEQ ID NO:5 - 6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70%の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列、
 - c) 前記a)に相補的なポリヌクレオチド配列、
- またはd)前記b)に相補的なポリヌクレオチド配列を含むことを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項11】 請求項10のポリヌクレオチドの少なくとも60個の連続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12】 請求項10のポリヌクレオチド配列を有するサンプル内の標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

a) 前記サンプル中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16個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルとをハイブリダイズするステップであって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドとによってハイブリダイゼーション複合体が形成される条件の下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、該ステップと、

b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在の有無を検出し、存在する場合には随意選択でその量を測定する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を検出する方法。

【請求項13】 前記プローブが少なくとも30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12に記載の方法。

【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12に記載の方法。

【請求項15】 有効量の請求項1のポリペプチド及び医薬的に容認できる賦形剤を含む医薬品組成物。

【請求項16】 請求項15の医薬品組成物を患者に投与することを含む、機能的CAPの発現の低下に関連する疾患やその症状の治療方法。

【請求項17】 請求項1のポリペプチドのアゴニストとして効果的な化

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) 前記サンプルの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18】 請求項17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医薬品組成物。

【請求項19】 請求項18の医薬品組成物を患者に投与することを含む、機能的CAPの発現の低下に関連する疾患やその症状の治療方法。

【請求項20】 請求項1のポリペプチドのアンタゴニストとして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) 前記サンプルの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21】 請求項20のスクリーニング方法によって同定されたアンタゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む医薬品組成物。

【請求項22】 請求項21の医薬品組成物を患者に投与することを含む、機能的CAPの過剰な発現に関連する疾患やその症状の治療方法。

【請求項23】 請求項4の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を効果的に変える化合物をスクリーニングする方法であって、

- a) 前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に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を含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(技術分野)**

本発明は、癌関連タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列、並びにこれらの配列を用いた細胞増殖異常症及び自己免疫異常/炎症性疾患の診断及び治療、予防に関する。

【0002】**(発明の背景)**

新形成とも呼ばれる癌の特徴は連続的な細胞増殖である。癌は、癌腫及び肉腫、白血病の3つに分類することができる。癌腫は、周囲の組織に浸潤して転移を起こし得る新しく増殖した軟質性の悪性上皮細胞である。肉腫には、上皮細胞を起源とするもの、或いは結合組織から生じるものがある。白血病は血液形成組織の進行性悪性腫瘍であって、白血球及びその前駆体を発生する。また、白血病は、骨髄性白血病(骨髄)とリンパ性白血病とに分類できる。腫瘍細胞は、起源組織の正常細胞に極めて類似した悪性細胞から、退形成(未分化)によって正常組織からかけ離れた細胞までと様々である。腫瘍細胞は、殆ど核を有しない或いは1つの大きな多形核を有し得る。退生細胞は、血管化しにくい構築異常集団に成長することがあり、その場合乏血性壊死領域を含み得る。分化した腫瘍細胞は、起源組織と同じタンパク質を分泌し得る。体腔若しくは表面腔の直接接種を介して、或いはリンパ拡散や血行拡散によって、癌が成長し、周囲の組織に浸潤及び転移し、組織を破壊する。

【0003】

癌は、正常細胞を悪性細胞に変え得るオンコプロテインに関連する。ある種のオンコプロテインは、正常なタンパク質の変異アイソフォームであり、一方別のオンコプロテインは、発現レベルや部位に対して異常に発現する。正常な細胞増殖は、成長因子が細胞膜のその受容体に結合することによって開始され、核調節因子を誘発し活性化するシグナル伝達系が活性化され、DNAの転写が開始され、細胞分化につながる。細胞周期の制御に影響を及ぼすとして知られるオンコプロテインのクラスには、成長因子及び成長因子受容体、細胞内シグナル伝達物質、

核転写因子、細胞周期制御タンパク質が含まれる。一般に、オンコプロテインは正常な調節要素が不足し、成長因子及び細胞接着などの他のシグナルに無関係に発現される。

【0004】

オンコプロテインは、オンコジーンと呼ばれる遺伝子によってコードされる。オンコジーンは、細胞の成長及び発達を正常に制御する遺伝子に由来する。ウイルスオンコジーンは、ある種のウイルスによってヒトの細胞に感染した後、ヒトゲノムの中に組み込まれる。ウイルスオンコジーンの中には、v-src及びv-abl、v-fpsが含まれる。正常な遺伝子からオンコジーンへの転換は、染色体の転座によっても起こり得る。慢性骨髄性白血病及び急性リンパ芽球性白血病のサブセットの特徴であるPhiladelphia染色体は、プロトオンコジーンc-ablの切断部分を染色体22の限界点クラスター領域(bcr:breakpoint cluster region)に転座させる染色体9と染色体22の相互転座から生じる。ハイブリッドc-abl-bcr遺伝子は、チロシンキナーゼ活性を有するキメラタンパク質をコードする。慢性骨髄白血病では、キメラタンパク質の分子量は210 kDaであり、急性白血病では、より活性な180 kDaのチロシンキナーゼが形成される(Robbins, S.L. 他(1994) Pathologic Basis of Disease, W.B. Saunders Co., Philadelphia PA)。

【0005】

癌に対する免疫的な防御には、癌抑制遺伝子による突然変異細胞のアポトーシスへの誘導、Tリンパ球による腫瘍抗原の認識が含まれる。腫瘍抗原には、種々の腫瘍及び精巣で発現するGAGE遺伝子によってコードされるものが含まれる。GAGE-7は、精巣及び胎盤の組織に特異的に発現し、前立腺癌の初期アンドロゲン感受性ステージから後期アンドロゲン不感性ステージへの進行に關与する(Chen, M.E. 他.(1998) *J. Biol. Chem.* 273:17618-17625)。

【0006】

癌の中には、正常なアポトーシス細胞死を抑制するものがある。別の染色体転座の例には、E2A遺伝子のトランス活性化ドメインが、HLFのbZIP DNA結合及びタンパク質二量体化領域と結合する、プロB細胞急性白血病に關連するE2AとHLFとの融合がある。HLFは、通常は肝臓及び腎臓、CNSニューロン細胞に発現するロイ

シンジッパー型転写因子である。キメラタンパク質は、プロB細胞のアポトーシスに關与する遺伝子の転写レベルを変化させると考えられる。プロB細胞は欠陥細胞が多く、通常は自己破壊的に生存し増殖する。SRPUL（白血病で増大するsushi反復タンパク質）は、E2A-HLF遺伝子タンパク質の標的の1つである。SRPULは、細胞接着において機能すると思われるコンセンサス反復モチーフを含む（Kurosawa, H. 他（1999）Blood 93:321-332）。

【0007】

新規の癌関連タンパク質及びそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、細胞増殖異常症及び自己免疫異常/炎症性疾患の診断及び治療、予防に有用な新規の組成物を提供することで当分野のニーズに答えることができる。

【0008】

（発明の要約）

本発明は、総称して「CAP」、個別にはそれぞれ「CAP-1」及び「CAP-2」、「CAP-3」と呼ぶ癌関連タンパク質である実質的に精製されたポリペプチドを提供する。本発明の一実施態様では、a) SEQ ID NO:1-3からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1-3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自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1-3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、またはd) SEQ ID NO:1-3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を含む単離したポリペプチドを提供する。別法では、SEQ ID NO:1-3のアミノ酸配列を含む単離したポリペプチドを提供する。

【0009】

更に本発明は、a) SEQ ID NO:1-3からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1-3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自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1-3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、またはd) SEQ ID NO:1-3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をポリペプチドをコードする単離したポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:4-6からなる一群から選択される。

【0010】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1 - 3からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1 - 3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自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1 - 3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、またはd) SEQ ID NO:1 - 3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。

【0011】

また、本発明は、a) SEQ ID NO:1 - 3からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1 - 3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自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1 - 3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、またはd) SEQ ID NO:1 - 3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を含むポリペプチドの製造方法を提供する。この方法は、a) このポリペプチドの発現に好適な条件の下で、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。

【0012】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1 - 3からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1 - 3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自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1 - 3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、またはd) SEQ ID NO:1 - 3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。

【0013】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:4 - 6からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列、b) SEQ ID NO:4 - 6からなる一群から選択されたポリヌクレオチド酸配列と70%以上の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列、c) 前記a) に相補的なポリヌクレオチド配列、またはd) 前記b) に相補的なポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、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である。

【0014】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:4 - 6からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列、b) SEQ ID NO:4 - 6からなる一群から選択されたポリヌクレオチドと70%以上の配列同一性を有する自然発生のポリヌクレオチド配列、c) 前記a) に相補的なポリヌクレオチド配列、またはd) 前記b) に相補的なポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有するサンプルの中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。この方法は、a) 前記サンプル内の標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を含む少なくとも16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、前記プローブが特異的に前記標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする、該ステップと、b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在の有無を検出し、存在する場合には随意選択でその量を測定するステップとを含む。別法では、前記プローブは、少なくとも30個の連続するヌクレオチドを含む。更なる別法では、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。

【0015】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1 - 3からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1 - 3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自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1 - 3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、またはd) SEQ ID NO:1 - 3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医薬品組成物を提供する。更に、

本発明は、患者にこの医薬品組成物を投与することを含む、機能的CAP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。

【0016】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1 - 3からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1 - 3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自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1 - 3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、またはd) SEQ ID NO:1 - 3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を含むポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、a) 前記ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、b) 前記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、前記方法によって同定されたアゴニスト化合物及び好適な医薬用賦形剤を含む医薬品組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この医薬品組成物の患者への投与を含む、機能的CAP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。

【0017】

更に、本発明は、a) SEQ ID NO:1 - 3からなる一群から選択されたアミノ酸配列、b) SEQ ID NO:1 - 3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自然発生のアミノ酸配列、c) SEQ ID NO:1 - 3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、またはd) SEQ ID NO:1 - 3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含むポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、a) 前記ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、b) 前記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、前記方法によって同定されたアンタゴニスト化合物及び好適な医薬用賦形剤を含む医薬品組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この医薬品組成物の患者への投与を含む、機能的CAP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。

【0018】

更に本発明は、SEQ ID NO:4 - 6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える効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、a) 前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に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を含む、該スクリーニング方法を提供する。

【0019】

(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。

【0020】

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。

【0021】

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。

【0022】

(定義)

用語「CAP」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CAPのアミノ酸配列を指す。

【0023】

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

【0024】

用語「アレル変異配列」は、CAP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、自然発生型のアレル変異配列が存在しないもの、1つ或いは多数存在するものがある。一般にアレル変異配列を生じる変異は、ヌクレオチドの自然な欠失、付加、或いは置換による。これらの各変異は、単独或いは他の変異と同時に起こり、所定の配列内で一回或いはそれ以上生じる。

【0025】

CAP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、CAPと同じポリペプチド或いはCAP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、CAP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合或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにCAP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CAP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CAP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。

【0026】

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」が自然発生のタンパク質分子である場合、「アミノ酸配列」及び類似の用語は、アミノ酸配列を、記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0027】

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。

【0028】

用語「アンタゴニスト」は、CAP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、CAPに直接相互作用するか、或いはCAPが関与する生物学的経路の成分と作用して、CAP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。

【0029】

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。CAP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産生可能である。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。

【0030】

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。

【0031】

用語「アンチセンス」は、特定の核酸配列のセンス鎖に相補的な核酸配列を含む任意の組成物を指す。アンチセンス分子は、合成や転写を含む任意の方法で作ることができる。相補的ヌクレオチドは、一度細胞に導入されると、細胞によって作られた自然の配列と結合して二重鎖を形成し、転写や翻訳を阻害する。「マイナス（-）」という表現はアンチセンス鎖、「プラス（+）」という表現はセンス鎖を指す。

【0032】

用語「生物学的活性」は、自然発生分子の構造的、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」は、天然或いは組換え体のCAP、合成のCAP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。

【0033】

用語「相補的」及び「相補性」は、ポリヌクレオチド同士が塩基対を形成して自然に結合することを指す。例えば、配列「5' A - G - T 3'」が相補的な配列「3' T - C - A 5'」と結合する。2つの一本鎖分子間の相補性は、幾つかの核酸のみが結合する部分的な場合、或いは一本鎖間に完全な相補性が存在して完全な相補性となる場合もあり得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強度に大きな影響を与える。このことは、核酸鎖間の結合に左右される増幅反応、並びにペプチド核酸（PNA）分子の設計若しくは使用において特に重要である。

【0034】

「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。CAP若しくはCAP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。

【0035】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにシーケンシングされた核酸配列であって、XL-PCR™（Perkin Elmer, Norwalk, CT）を用いて5'及び/または3'の方向に延長されてシーケンシングされた核酸配列、或いはGELVIEW断片構築システム（GCG, Madison, WI）などのフラグメントの構築のためのコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上のインサイトクローン、及び場合によっては、1つ以上のパブリックのドメインESTの重複によって構築された核酸配列を指す。延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。

【0036】

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。

【0037】

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。

【0038】

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。

【0039】

用語「断片」は、CAPまたはCAP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。

【0040】

SEQ ID NO:4-6のある断片は、例えば、同じゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:4-6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:4-6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:4-6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:4-6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。

【0041】

SEQ ID NO:1-3のある断片は、SEQ ID NO:4-6のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1-3のある断片は、特異的にSEQ ID NO:1-3を同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO:1-3のある断片は、特異的にSEQ ID NO:1-3を認識する抗体の作製用の免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:1-3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。

【0042】

用語「類似性」は相補性の程度を表す。これには、部分的類似性と完全な類似性とがある。用語「同一性」を「類似性」とも言える。同一の配列と標的の核酸とのハイブリダイゼーションが少なくとも部分的に阻止される部分的に相補的な配列は、「実質的に類似」と呼ばれる。完全に相補的な配列と標的の配列とのハイブリダイゼーションの阻止は、緩いストリンジェントな条件の下、ハイブリダイゼーションアッセイ（サザンブロットニング或いはノーザンブロットニング法、溶液ハイブリダイゼーション等）を用いて検査される。実質的に類似の配列或いはハイブリダイゼーションプローブは、緩いストリンジェントな条件の下、完全に類似（同一）の配列と標的の配列との結合に対して競合して抑制する。これは、緩いストリンジェントな条件の下では非特異的な結合が許容されるということではなく、緩いストリンジェントな条件では、2つの配列の互いへの結合が特異的（即ち、選択的）に相互作用しなければならない。部分的な相補性ともいえない（例えば、30%未満の類似性或いは同一性）第2の標的配列を用いて、非特異的結合が存在しないことの検査が可能である。非特異的結合が存在しない場合は、実質的に類似配列或いはプローブが第2の非相補的標的配列とハイブリダイズしない。

【0043】

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」又は「%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。

【0044】

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ーは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。「重み付けされた」残基重み付け表が、デフォルトとして選択された。同一性のパーセントは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列の対の「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

【0045】

別法では、一般に用いられ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式が、NCBI、Bethesda、MD、及びインターネット (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) などから入手できるNational Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)によって得られる。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、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp (以下に記載) の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、デフォルトを設定するギャップ及び他のパラメーターと共に用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較する場合、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、以下のようになる。

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

同一性のパーセントは、例えば、特定の配列番号で決められた、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。

【0046】

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。

【0047】

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」又は「%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。

【0048】

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ーは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、及び「diagonals saved」=5と設定する。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドアライ

ンメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の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。

【0049】

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 (April-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。

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。

【0050】

「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配列を含み得り、安定した有糸分裂染色体の分離及び維持に必要な全ての要素を含む直鎖状の小染色体である。

【0051】

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。

【0052】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件の下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成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同一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の下で、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ент (stringency) の決定において特に重要であり、よりストリンジент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ент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 μg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0053】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジент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, Plainview NY; 特に2巻の9章に記載されている。

【0054】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジентなハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約1%のSDSの存在の下、約68℃で1時間の洗浄過程を含む。別法では、65℃、60℃、55℃、42℃の温度で行う。SSCの濃度は、約0.1%のSDSが存在の下、約0.1～2×SSCの範囲である。通常は、遮断剤を用いて非特異的なハイブリダイゼーションを阻止する。このような遮断

剤には、例えば、約100～200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性したサケ精子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。

【0055】

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、フィルター、チップ、ピン、或いはスライドガラス、または細胞及びその核酸を固定する任意の適当な基板）に固定されたもう一つの核酸配列とで形成され得る。

【0056】

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。

【0057】

「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。

【0058】

用語「マイクロアレイ」は、基板上に配列されたそれぞれ異なったポリヌクレオチドの配列を指す。

【0059】

マイクロアレイの文脈に用いられる用語「要素」或いは「アレイ要素」は、基板の表面に配列されたハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドを指す。

【0060】

用語「変調」は、CAPの活性の変化を指す。例えば、変調によって、CAP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。

【0061】

用語「核酸」或いは「核酸配列」は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、或いはそれらの断片を指す。また、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様物質を指す。

【0062】

「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。

【0063】

「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、アンチセンス分子又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。

【0064】

「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、CAP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一本鎖に沿って延長される。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。

【0065】

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。

【0066】

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。

【0067】

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、マイクロアレイ要素、或いはサンプルの核酸の完全或いは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定する特定のプローブなどの、ハイブリダイゼーション技術に有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記した方法に制限されるものではない。

【0068】

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。

【0069】

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、ワクチン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。

【0070】

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

【0071】

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。

【0072】

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%以上除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましいのは約90%以上除去されたものを指す。

【0073】

「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。

【0074】

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、膜及びフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビード、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。この基板には、壁または塹壕、ピン、チャンネル、細孔などの様々な表面形態があり、そこにポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0075】

「形質転換」とは、外来DNAが入り込み受容体細胞を変化させるプロセスのことである。形質転換は、当分野で周知の種々の方法により、自然或いは人工の条件の下で起こり得り、原核宿主細胞若しくは真核宿主細胞の中に外来核酸配列を挿入する任意の周知の方法によって行うことができる。この形質転換の方法は、形質転換される宿主細胞のタイプによって選択される。この方法には、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。

【0076】

特定の核酸配列の「変異配列」とは、デフォルトパラメーター設定の「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(population)、病態、病態の特徴を表し得る。

【0077】

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ー設定の「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%と決定された核酸配列のことである。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。

【0078】

(発明)

本発明は、新規の癌関連タンパク質(CAP)及びCAPをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、細胞増殖異常症及び自己免疫異常/炎症性疾患の診断、治療、及び予防におけるそれらの組成物の使用に関する。

【0079】

本発明のCAP-1をコードする核酸は、核酸及び/またはアミノ酸配列のアライメント用のコンピュータ検索によって、ヒト膀胱腫瘍cDNAライブラリ(BLADTUT04)のインサイト社クローン1518859H1において同定された。コンセンサス配列であるSEQ ID NO:4は、インサイト社クローン番号1518859H1 (BLADTUT04), 2634789F6 (COLNTUT15), 2762312F6 (BRSTNOT12)、及び配列SBCA02155F1, SBCA05656F1, SBIA02789D1, SBIA03101D1 (プールされたcDNAライブラリ由来)の核酸配列の重複及び/または伸長によって導き出された。

【0080】

一実施例では、本発明は、図1A - 図1Fに示されているように、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。CAP-1はアミノ酸465個の長

さであり、S112残基における1個の潜在的なサイクリックAMP及びサイクリックGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位と、S36及びT85、S143、S170、T242、S279、S348、T377、T436、T442、S450残基における11個の潜在的なカゼインキナーゼリン酸化部位と、T6及びS73、S108、T200、T222、S252、T266、S308、S353、T455残基における10個のプロテインキナーゼリン酸化部位と、Y431残基における1個の潜在的なチロシンキナーゼリン酸化部位とを有する。PFAM分析によって、CAP-1が、C59からC117残基及びC122からC176残基、C264からC319残基において、Sushi (短いコンセンサス反復) ドメインモチーフと相同性を有することが示された。SPScan及びHMM分析によって、CAP-1が、M1から約T22残基における潜在的なシグナルペプチド配列を有することが示された。図4A及び図4Bに示されているように、CAP-1は、ラットdrs (v-srcによってダウンレギュレートされた) 遺伝子作成物 (GI 1345423; SEQ ID NO:7) と化学的及び構造的類似性を有する。SEQ ID NO:4のヌクレオチドの概ね1057から1101番目までの断片は、例えば、SEQ ID NO:4の同定、及びSEQ ID NO:4と関連配列とを区別するハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用である。コードされたポリペプチドは、例えば免疫原性ペプチドとして有用である。ノーザン分析によって、この配列が様々なライブラリで発現し、その内の少なくとも57%が細胞増殖に関連し、少なくとも24%が炎症及び免疫応答に関連することが示された。特に注目すべきは、CAP-1が心血管組織 (33%) 及び神経組織 (29%)、胃腸組織 (14%) において発現することである。

【0081】

本発明のCAP-2をコードする核酸は、核酸及び/またはアミノ酸配列のアライメント用のコンピュータ検索によって、ヒト胆嚢cDNAライブラリ (GBLANOT01) のインサイト社クローン2616269H1において同定された。コンセンサス配列であるSEQ ID NO:5は、インサイト社クローン番号2616269H1 (GBLANOT01) 及び3557735H1 (LUNGNOT31), 1965572R6 (BRSTNOT04), 2182972F6 (SININOT01), 1857443F6 (PROSNOT18), 3568062H1 (HEAPNOT01), 1878060T6 (LEUKNOT03), 1795056R6 (PROSTUT05), 1486038H1 (CORPNOT02)の核酸配列の重複及び/または伸長によって導き出された。

【0082】

一実施例では、本発明は、図2A - 図2Eに示されているように、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。CAP-2はアミノ酸278個の長さであり、T50残基における1個の潜在的なサイクリックAMP及びサイクリックGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位と、S29及びT50、S187残基における3個の潜在的なカゼインキナーゼIIリン酸化部位と、T183及びT211、S219、S312、T380残基における5個の潜在的なプロテインキナーゼCリン酸化部位とを有する。PFAM分析によって、CAP-2が、R141からK177残基及びS180からP216残基、G233からD264残基、M271からD308残基において、WDドメインG 反復モチーフと相同性を有することが示された。PRINTS分析によって、CAP-2が、I164からI178残基及びI203からL217残基、L295からL309残基において、WDドメインG 反復モチーフと相同性を有することが示された。SPScan分析によって、CAP-2が、M1から約A35残基における潜在的なシグナルペプチドを有することが示された。図5A及び図5Bに示されているように、CAP-2は、ヒトBCR遺伝子タンパク質(GI 487348; SEQ ID NO:8)と化学的及び構造的類似性を有する。特に、CAP-2は、ヒトbcr-abl遺伝子タンパク質と44%の同一性を有する。SEQ ID NO:5のヌクレオチドの概ね483から527番目までの断片は、例えば、SEQ ID NO:5の同定、及びSEQ ID NO:5と関連配列とを区別するハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用である。コードされたポリペプチドは、例えば免疫原性ペプチドとして有用である。ノーザン分析によって、この配列が様々なライブラリで発現し、その内の少なくとも52%が細胞増殖に関連し、少なくとも34%が炎症及び免疫応答に関連することが示された。特に注目すべきは、CAP-2が生殖組織(30%)及び神経組織(22%)、胃腸組織(16%)において発現することである。

【0083】

本発明のCAP-3をコードする核酸は、核酸及び/またはアミノ酸配列のアライメント用のコンピュータ検索によって、ヒト肺腫瘍cDNAライブラリ(LUNGTUT13)のインサイト社クローン3117642H1において同定された。コンセンサス配列であるSEQ ID NO:6は、インサイト社クローン番号3117642H1及び3117642F6(LUNGTUT13)、1980062H1(LUNGTUT03)、791000R1(PROSTUT03)の核酸配列の重複及び/

または伸長によって導き出された。

【0084】

一実施例では、本発明は、図3A及び図3Bに示されているように、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。CAP-3はアミノ酸400個の長さであり、S19及びS23、T41、T71、T113、T136残基における6個の潜在的なカゼインキナーゼIIリン酸化部位と、T81残基における1個の潜在的なプロテインキナーゼCリン酸化部位とを有する。図6に示されているように、CAP-3は、ヒトGAGE-7前立腺腫瘍抗原(GI 3511023; SEQ ID NO:9)と化学的及び構造的類似性を有する。特に、CAP-3は、ヒトGAGE-7前立腺腫瘍抗原と18%の同一性を有する。SEQ ID NO:6の概ね117から159番目までの断片及びヌクレオチドの概ね262から306番目までの断片は、例えば、SEQ ID NO:6の同定、及びSEQ ID NO:6と関連配列とを区別するハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用である。各断片によってコードされたポリペプチドは、例えば、免疫原性ペプチドとして有用である。ノーザン分析によって、この配列が4つのライブラリで発現し、その全てが細胞増殖に関連することが示された。その4つのライブラリの内の2つが肺腫瘍組織に由来し、1つが前立腺腫瘍組織に由来し、1つがK562慢性骨髄性白血病前駆細胞株に由来する。

【0085】

本発明はまた、CAPの変異体も含む。好適なCAPの変異体は、CAP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CAP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95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0086】

本発明はまた、CAP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、CAPをコードするSEQ ID NO:4-6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。

【0087】

本発明はまた、CAP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、CAP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:4-6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:4-6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、CAP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。

【0088】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るCAPをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、既知の自然発生する任意の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したがって本発明には、可能なコドン選択に基づいた組み合わせの選択によって作り出され得る可能なポリヌクレオチド配列の変異の全てが含まれ得る。これらの組み合わせは、自然発生のCAP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。

【0089】

CAPをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は、好適に選択されたストリンジェントな条件の下で、自然発生のCAPのヌクレオチドとハイブリダイズ可能なことが望ましいが、非自然発生のコドンを含めるなどの実質的に異なったコドンの使用を有するCAP或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作り出すことは有益となり得る。特定のコドンが宿主によって利用される頻度に基づいてコドンを選択して、ペプチドの発現が特定の真核細胞又は原核宿主に発生する割合を高めることが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えないで、CAP及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、自然発生の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることにある。

【0090】

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

【0091】

更に本発明には、種々のストリンジェント条件の下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:4 - 6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。

【0092】

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 (Perkin Elmer)、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 (Perkin-Elmer) 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(Perkin-Elmer)、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)。

【0093】

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

【0094】

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

ブラリは、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【0095】

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、Perkin-Elmer）を用いて電気信号に変換され、サンプルのローディングからコンピュータ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。

【0096】

本発明の別の実施例では、CAP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CAP、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CAPのクローン化及び発現に利用可能である。

【0097】

種々の目的でCAP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の仲介による定方向突然変異誘発を利用して、新しい制限部位を生成する突然変異の導入、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライスバリエントの生成等が可能である。

【0098】

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、CAP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CAPの生物学的特性を変更或いは向上させることができる。DNA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が作製されるプロセスである。次に、このライブラリは、目的の特性を備えた遺伝子変異体を同定するための選択或いはスクリーニングが行われる。これらの好ましい変異体はプールされ、DNAシャフリング及び選択/スクリーニングが繰り返される。従って、人工的な育種及び急速な分子の進化によって多様な遺伝子が作られる。例えば、ランダムな位置に変異がある1つの遺伝子の断片を組換えてスクリーニングし、目的の特性が最適となるまで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基づい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化することができる。

【0099】

別の実施例によれば、CAPをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である(例えば、Caruthers, M.H.等(1980) 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CAP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、Roberge, J.Y.等(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(Perkin Elmer)を用いて達成し得る。更にCAPのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、変異体ポリペプチドを作ることが可能である。

【0100】

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, T. (1983) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York, NYを参照)。

【0101】

生物学的に活性なCAPを発現させるために、CAP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要素を含む。これらの要素には、ベクター及びCAPをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このような要素は、その長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、CAP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。CAP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)。

【0102】

当業者に周知の方法を用いて、CAPをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節要素を含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる。(

例えば、 Sambrook, J. 他. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4章及び8章, 及び16-17章; 及び Ausubel, F.M. 他. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9章及び13章1-4章を参照)。

【0103】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、CAP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。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。

【0104】

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、CAP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、CAP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pSPORT1プラスミド(GIBCO 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CAPをコードする配列をライゲーションするとlacZ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更に、これらのベクターを用いて、クローニングされた配列の*in vitro*での転写、ジデオキシンスクリーニング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失を作り出すことが可能である。(例えば、Van Heeke, G.及びS.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509.を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のCAPが必要な場合は、CAP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。

【0105】

CAP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、上記のAusubel.; 及びBitter, G.A. 他 (1987) *Methods Enzymol.* 153:51-794; Scorer, C. A. 他 (1994) *Bio/Technology* 121 - 181-184. を参照)

植物系もCAPの発現に使用可能である。CAPをコードする配列の転写は、例えば、CaMV由来の35S及び19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターが単独で、或いはTMV (Takamatsu, N.等 (1987) *EMBO J* 6:307-311) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせて促進される。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)。

【0106】

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CAP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CAP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。

【0107】

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）。

【0108】

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

【0109】

任意の数の選択系を用いて、形質転換された細胞系を回収することが可能である。選択系には、以下のものに限定はしないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子が含まれ、それぞれ tk^{-} 又は apr^{-} 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（*cCAPsulfuron*）、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)。

【0110】

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、CAP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、CAP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CAP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。

【0111】

一般に、CAPをコードする核酸配列を含み、CAP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。

【0112】

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CAP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。CAP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 Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; 及び Pound, J.D. (1990) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ)。

【0113】

種々の標識方法及び結合方法が当業者には周知であり、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイに用いられ得る。CAP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、CAP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。

【0114】

CAP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の下で培養される。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。CAP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CAP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。

【0115】

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ッシングする能力によって宿主細胞株が選択される。このようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化 (lipidation)、及びアシル化が含まれるが、これらに限定されるものではない。タンパク質の「prepro」または「pro」形を切断する翻訳後のプロセッシングを利用して、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ッシングを確実にするために選択される。

【0116】

本発明の別の実施例では、CAP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CAPタンパク質が、CAPの活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分が、市販の親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。このような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-mc、赤血球凝集素 (HA) が含まれるが、これらに限定されるものではない。GST及びMBP、Trx、CBP、6-Hisによって、固定されたグルタチオン、マルトース、フェニルアルシン酸化物 (phenylarsine oxide)、カルモジュリン、金属キレート樹脂のそれぞれで同族の融合タンパク質の精製が可能となる。FLAG、c-mc、及び赤血球凝集素 (HA) によって、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販のモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いた融合タンパク質の免疫親和性の精製ができる。また、CAP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、CAP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。

【0117】

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CAP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。

【0118】

CAPの断片は、組換え生成物だけでなく固相技術を用いて直接的なペプチド合成によって作製され得る(例えば、前出のCreighton, pp. 55-60.を参照)。タンパク質の合成は、手動或いは自動で行われ得る。自動合成は、例えばABI 431Aペプチドシンセサイザ(Perkin Elmer)を用いて行うことが可能である。CAPの種々の断片は別々に合成して、次ぎに結合させて完全長分子を生成する。

【0119】

(治療)

CAPのある領域と癌関連タンパク質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、CAPの発現は、細胞増殖異常症及び自己免疫異常/炎症性疾患と密接に関連する。従って、CAPは、細胞増殖異常症及び自己免疫異常/炎症性疾患においてある役割を果たすと考えられる。CAP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、CAPの発現または活性を低下させることが望ましい。また、CAP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、CAPの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0120】

従って、一実施例において、CAP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CAPまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、細胞増殖異常症が含まれ、そ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）、骨髓線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、子宮の癌などが含まれ、また、自己免疫異常症／炎症性疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群（AIDS）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（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、心筋又は心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、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、体外循環と、ウィルス感染症及び細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症、外傷が含まれる。

【0121】

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CAP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、CAP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。

【0122】

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CAP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CAPを含む医薬品組成物を好適な医薬用担体と共に患者に投与することも可能である。

【0123】

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CAP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、CAP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。

【0124】

更なる実施例では、CAP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CAP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、上記した細胞増殖異常症及び自己免疫異常/炎症性疾患が含まれる。一実施態様では、CAP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CAP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。

【0125】

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CAP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、CAPをコードするポリヌクレオチドの相補体 (complement) 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。

【0126】

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。

【0127】

CAP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CAP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CAPと特異的に結合するものを同定が可能である。CAP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。

【0128】

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、CAP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。

【0129】

CAP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のアミノ酸からなり、一般的には約10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く、小さな自然発生の分子の全アミノ酸配列も含む。CAPアミノ酸の短い伸展部は、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。

【0130】

CAPに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製することが可能である。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、及びEBV-ハイブリドーマ技術が含まれるが、これらに限定されるものではない（例えば、Kohler, G. 等. (1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D. 等. (1985) J. Immunol. Methods 81 - 8-42; Cote, R.J. 等. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030; Cole, S.P. 等. (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120を参照）。

【0131】

更に、「キメラ抗体」の作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる（例えば、Morrison, S.L.他. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81 - 4851 - 4855; Neuberger, M.S.他. (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.等. (1985) Nature 314:452,454を参照）。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、CAP特異性一本鎖抗体を生成する。関連する特異性を備えるが別のイデオタイプ組成の抗体は、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリから鎖混合によって生成することもできる（例えば、Burton D.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:11120-3を参照）。

【0132】

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又は文献に示されているような、高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって、産生することもできる（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）。

【0133】

CAPに対する特異的な結合部位を含む抗体も産生することができる。例えば、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって生成されるF(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. 等. (1989) Science 254:1275-1281を参照）。

【0134】

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、CAP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CAP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)。

【0135】

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、CAP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CAP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CAP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、CAP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CAP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、CAP抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。 K_a 値が $10^6 \sim 10^7 \text{ L/mol}$ の低親和性抗体医薬は、CAPが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製(immunopurification)及び類似の処理に用いるのが好ましい。(Catty, D. (1988) *Antibodies, Volume I: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0136】

ある下流の適用についての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、CAP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)。

【0137】

本発明の別の実施例では、CAPをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片または相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施形態では、CAPをコードするポリヌクレオチドの相補配列がmRNAの転写を阻止するのに好適である場合、これを使用することができる。特に細胞は、CAPをコードするポリヌクレオチドと相補的な配列で形質転換することもできる。したがって、相補的分子または断片は、CAPの活性の調節、または遺伝子機能の調節のために使用することができる。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、CAP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。

【0138】

レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペス又はワクシニア、又は様々な細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的の器官、組織又は細胞集団に運ぶこともできる。当業者に周知の方法を用いてCAPをコードするポリヌクレオチドと相補的な核酸配列を発現するベクターを作製することができる(例えば、前出のSambrook 他、及び前出のAusubel 他によるものを参照)。

【0139】

CAPをコードする遺伝子は、CAPをコードするポリヌクレオチド又はその断片を高いレベルで発現する発現ベクターで、細胞又は組織を形質転換することによって止めることができる。このような作製物を用いて翻訳できないセンス又はアンチセンス配列を細胞の中に導入することができる。DNAの中に組み入れられない場合でも、このようなベクターは内在性のヌクレアーゼによって機能が損なわれるまでmRNA分子を転写し続ける。非複製ベクターでも一過性の発現を一ヶ月以上に亘って続け、好適な複製要素がベクター系の一部である場合はさらに長く持続し得る。

【0140】

上記した通り、遺伝子の発現は、CAPをコードする遺伝子の制御5'または調節領域に対する相補的な配列またはアンチセンス分子(DNA或いはRNA、PNA)を設計することによって調節することができる。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ることが可能

である。同様に、「三重らせん」と塩基対合法を用いて阻止することができる。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. 等. (1994) In: Huber, B.E. 及び B.I. Carr, *Molecular and Immunologic 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。

【0141】

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、CAP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。

【0142】

任意の潜在的RNA標的の中の特異的なリボザイム切断部位が、後続の配列GUA、GUU、及びGUCを含むリボザイム切断部位に対して、標的分子をスキ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。

【0143】

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CAP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。

【0144】

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でのホスホジエステラーゼ結合よりむしろホスホチオネート又は2' Oメチルの使用が含まれる、がこれらに限定されるものではない。PNAの生成に固有のこの概念は、内在性のエンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンのアセチル -、メチル -、チオ -、及び同様の修飾形態だけでなく、イノシン、キューエオシン (queosine)、及びワイプトシン (wybutosine) などの従来のものでない塩基を含めることによって、これらの分子の全体に拡大することができる。

【0145】

ベクターを細胞又は組織に導入する多数の方法が利用でき、*in vivo*、*in vitro*、及び*ex vivo*での使用に等しく適している。*ex vivo*での治療の場合、患者から採取された肝細胞の中にベクターを導入して、自家移植で同じ患者に戻すためにクローニング増殖される。トランスフェクション、リボソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる運搬は、当分野で周知の方法を用いて実行することができる (例えば、Goldman, C.K. 他. (1997) Nature Biotechnology 15:462-66:を参照)。

【0146】

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。

【0147】

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。このような医薬品組成物は、CAP、CAPに対する抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、又はCAP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、単独或いは薬物又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。

【0148】

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

【0149】

活性処方成分に加えて、これらの医薬品組成物には、活性化合物を医薬的に使用可能な薬剤にするのを容易にする、医薬品添加物及び補助剤を含む好適な薬学的に認められる担体が含まれ得る。製剤及び投与についての詳しい技術については、最新版のRemington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, PA)に記載されている。

【0150】

経口投与用の医薬品組成物が、経口投与に好適な投与量において当分野で周知の薬学的に許容される担体を用いて、製剤することができる。このような担体により、医薬品組成物が患者が摂取するために、錠剤、丸薬、糖衣剤、カプセル、液体、ゲル状、シロップ剤、泥状物、懸濁液として製剤される。

【0151】

経口用に用いられる医薬品は、活性化合物と固体の薬品添加物とを混合し、得られた顆粒の混合物を処理して、(所望に応じてすりつぶした後)タブレット或いは糖衣錠コア(dragee cores)にする。好適な医薬品添加物とは、ラクトース、スクロース、マンニトール、又はソルビトールを含む糖類、トウモロコシ、小麦、米、ジャガイモ、又はその他の植物からのでんぷん、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、又はカルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース、アラビアゴム及びトラガカントゴムを含むゴム、ゼラチン

及びコラーゲンなどのタンパク質などの炭水化物又はタンパク質賦形剤である。必要に応じて、例えば、架橋結合したポリビニルピロリドン、かんてん、アルギン酸、またはその塩であるアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤または可溶化剤が加えられる。

【0152】

糖衣錠コアは、濃縮糖溶剤などの好適なコーティングと共に用いられる。このような濃縮糖溶剤には、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポルゲル (carbopol gel)、ポリエチレングリコール、及び/または二酸化チタン、ラッカー溶剤、及び好適な有機溶媒または混合溶剤などが含まれ得る。染料または色素が、製品の識別又は活性化合物の量、即ち薬用量を示すため、錠剤または糖衣錠に加えられる。

【0153】

経口用に用いられる医薬品製剤には、ゼラチンから作られたプッシュ-フィット型のカプセル、グリセロールまたはソルビトールなどのコーティングとゼラチンからなる封入されたカプセルが含まれる。プッシュ-フィット型のカプセルには、ラクトース又はスターチなどの賦形剤や結合材、タルク又はステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、所望に応じて安定剤と混合された活性処方成分が含まれる。ソフトカプセルでは、活性化合物が、安定剤と共に或いは安定剤なしで、脂肪油、溶液、またはポリエチレングリコール溶液などの好適な溶液に溶解或いは懸濁され得る。

【0154】

非経口投与用に好適な医薬品剤が、水溶液で製剤されるが、ハックス液、リンガー液、生理緩衝食塩水などの生理学的に適合性のある緩衝剤が好ましい。水性懸濁注射液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、又はデキストランなどの懸濁液の粘性を高める物質を含み得る。更に、活性化合物の懸濁液は、好適な油性注入懸濁液として製剤され得る。好適な親水性溶液または媒体には、ごま油などの脂肪油、オレイン酸エチル、トリグリセリド又はリボソームなどの合成脂肪酸が含まれる。非脂質ポリカチオンアミノポリマーが、運搬目的で使用される。随意選択により、懸濁液は高濃度の溶液が可能となるよう化合

物の溶解性を高める好適な安定剤または薬剤を含み得る。

【0155】

局部または鼻腔投与のために、特定の障壁に浸透する好適な浸透剤が製剤に用いられる。このような浸透剤は当業者には周知である。

【0156】

本発明の医薬品組成物は、当分野で周知の方法、例えば従来混合、溶解、顆粒化、糖衣化、溶離(levigating)、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥処理を用いて製造され得る。

【0157】

医薬品組成物は塩類として製剤され、限定されないが、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等の多くの酸と共に形成可能である。塩分は対応する遊離塩基系よりも、水溶剤または他のプロトン溶剤に溶けやすい。別の薬剤の形態には、1 mM ~ 50 mM ヒスチジン、0.1% ~ 2% スクロース、及び2% ~ 7% マンニトールの幾つか或いは全てを含み、pHの範囲が4.5 ~ 5.5であり、使用前に緩衝剤と結合する凍結乾燥粉末を用いることができる。

【0158】

医薬品組成物が調合された後、それらは適当な箱に詰められ、指定した症状の薬としてラベルが貼られる。CAPの投与のため、このようなラベルには、量、頻度、及び投与の方法が含まれるであろう。

【0159】

本発明に用いる好適な医薬品組成物には、目的を達成するため、効果的な量の活性処方成分を含む組成物が含まれる。当業者は、自分の能力で十分に効果的な服用量を決めることができる。

【0160】

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

【0161】

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CAP又はその断片、CAPの抗体、CAP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、ED₅₀（服用に対して集団の50%に医薬的效果がある）またはLD₅₀（服用に対して集団の50%に致命的である）統計を計算するなど、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって決定することができる。毒性効果と治療効果との薬用量比は治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀と示すことができる。高い治療指数を示す医薬品組成物が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータが、ヒトへの適用のために、薬用量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる薬用量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀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。

【0162】

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

【0163】

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

特定の細胞、状態、位置などに対して特異的であろう。

【0164】

(診断)

別の実施例では、CAPに特異的に結合する抗体が、CAPの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはCAPやCAP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。CAP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CAP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。

【0165】

CAP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CAP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CAP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CAP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CAPの発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが標準値と比較される。標準値と被験者との間の偏差が、疾患を診断するパラメーターとなる。

【0166】

別の実施例によれば、CAP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CAP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、CAPの不在、存在、及び過度の発現を調べ、治療中のCAPレベルの制御を監視する。

【0167】

ある実施形態では、CAP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、CAP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CAP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。

【0168】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、CAP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:4-6の配列、或いはCAP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。

【0169】

CAP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、CAP及びCAP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。

【0170】

CAPをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、CAPの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、細胞増殖異常症が含まれ、そ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、子宮の癌などが含まれ、また、自己免疫異常症/炎症性疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)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(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、心筋又は心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、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、体外循環と、ウィルス感染症及び細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症、外傷が含まれる。CAPをコードするポリヌクレオチド配列は、サザーン法やノーザン法、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CAP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。

【0171】

特定の形態において、CAP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。CAPをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件の下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。好適な培養期間の後、サンプルを洗浄し、シグナルを

定量して標準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が、制御サンプルと比較して著しく変わっている場合は、サンプル内のCAP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。

【0172】

CAP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、正常あるいは標準的な発現の概要が確立される。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、CAPをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な被験者から得た値と周知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが用いられる実験からの値とを比較することによって定量可能である。正常なサンプルから得た標準的な値を、疾患の症状を示す被験者から得た値と比較可能である。標準値と被験者の値との偏差を用いて疾患の存在を確定する。

【0173】

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。

【0174】

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。この種の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。

【0175】

CAP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CAPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはCAP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エントな条件の下、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。

【0176】

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

【0177】

別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドまたはそれより長い断片を、マイクロアレイにおける標的として用いる。マイクロアレイを用いて、同時に極めて多くの遺伝子の発現レベルを監視し、遺伝子の変異、突然変異及び多形性を識別する。この情報は、遺伝子機能の決定、疾患の遺伝的根拠の解釈、疾患の診断、及び治療薬剤の活性の監視及び開発に有用である。

【0178】

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)

本発明の別の実施例ではまた、CAPをコードする核酸配列を用いて、自然発生のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを生成することが可能である。この配列は、以下のものに対してマッピングされる。特定の染色体、染色体の特定領域または人工生成の染色体、例えば、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、細菌P1生成物或いは単一染色体cDNAライブラリである。(例えば、Harrington, 1.3. 他(1997) Nat Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 5-87-134, 及びTrask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154を参照)

in situ蛍光ハイブリダイゼーション(FISH)は、他の物理的染色体マッピング技術及び遺伝マップデータと相関するであろう(例えば、Heinz-Ulrich, 他による(1995) in Meyers, 前出, pp. 965-968.を参照)。遺伝子マップデータの例は、種々の科学誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man(OMIM)の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。物理的な染色体マップ上のCAPをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、このような疾患と関係するDNAの領域を決定するのに役立つ。本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者と、保有者、及び感染した者との遺伝子配列における違いを検出することもある。

【0179】

染色体標本のin situハイブリダイゼーション、及び確定した染色体マーカーを用いた結合分析などの物理的マッピング技術を用いて、遺伝子マップを拡張することもできる。マウスなどの別の哺乳動物の染色体上での遺伝子の配置により、たとえ特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていなくても、関連するマーカーが明らかになることが多い。新規の配列を、物理的なマッピングによって、染色体アームに割り付けることもできる。このことは、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、価値ある情報である。疾患或いは症候群の位置が、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。

【0180】

本発明の別の実施例では、CAP、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。CAP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。

【0181】

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、CAP、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CAPが、当分野で周知の方法で検出される。精製されたCAP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。

【0182】

別の実施例では、CAPと結合可能な中和抗体がCAP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、CAP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。

【0183】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にCAP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。

【0184】

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。

【0185】

前出及び以下に記載した全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国出願通し番号[1999年1月22日に出願した代理人整理番号PF-0661P]に言及することをもって本明細書の一部とする。

【0186】

(実施例) BLADTUT

1 cDNAライブラリの作製

CAP-1

BLADTUT04ライブラリは、60歳白人男性の根治膀胱切除及び前立腺切除、精管切除術の際に採取した膀胱腫瘍組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、グレード3の左膀胱壁の移行上皮癌であった。上皮内癌がドーム及び三角で見つかった。家族歴には、I型糖尿病及び胃の悪性腫瘍、アテローム硬化性冠状動脈疾患、急性心筋梗塞があった。

【0187】

この凍結組織を、Polytron PT-3000ホモジナイザー(Brinkmann Instruments, Westhury NJ)を用いて、グアニジンイソチオシアネート液中でホモジナイズし溶解した。RNAを、StratageneのRNA単離プロトコル(Stratagene, San Diego CA)に従って単離した。RNAを、酸性フェノールで2回抽出し、酢酸ナトリウムとエタノールで沈殿させ、RNA分解酵素を含まない水で再懸濁し、DNA分解酵素で処理した。OLIGOTEXキット(QIAGEN, Chatsworth CA)を用いてポリ(A+) RNAを単離した。

【0188】

CAP-2

GBLANOT01ライブラリは、53歳白人女性の胆嚢摘出の際に採取した病変胆嚢組

織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、軽度の急性胆嚢炎及び約150個の胆石を伴った胆石症を示していた。家族歴には、良性高血圧症があった。

【0189】

この凍結組織を、Polytron PT-3000ホモジナイザー (Brinkmann Instruments, Westbury NY) を用いて、フェノール及びグアニジンイソチオシアネートの単相液であるTRIZOL試薬 (組織1g / TRIZOL 10ml ; Life Technologies) の中でホモジナイズして溶解した。氷上で短時間インキュベートした後、クロロホルムを加え (1:5 v/v)、混合液を遠心分離して各相に分離した。上澄水相を新しいチューブに移し、イソプロパノールを加えてRNAを沈殿させた。RNAを、RNA分解酵素を含まない水で再懸濁し、DNA分解酵素で処理した。RNAを、酸性フェノールクロロホルムで再抽出し、酢酸ナトリウム及びエタノールで沈殿させた。OLIGOTEX mRNA精製キット(QIAGEN)を用いて、ポリ(A+) RNAを単離した。

【0190】

CAP-3

LUNGTUT13ライブラリは、47歳白人男性の肺区域切除術の際に採取した腫瘍肺組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、グレード3 (4の3) の浸潤性の腺癌を示していた。家族歴には、アテローム硬化性冠状動脈疾患及びII型糖尿病があった。

【0191】

この凍結組織を、Polytron PT-3000ホモジナイザー (Brinkmann Instruments, Westbury NY) を用いて、フェノール及びグアニジンイソチオシアネートの単相液であるTRIZOL試薬 (組織1g / TRIZOL 10ml ; Life Technologies) の中でホモジナイズして溶解した。氷上で短時間インキュベートした後、クロロホルムを加え (1:5 v/v)、混合液を遠心分離して各相に分離した。上澄水相を新しいチューブに移し、イソプロパノールを加えてRNAを沈殿させた。RNAを、RNA分解酵素を含まない水で再懸濁し、DNA分解酵素で処理した。RNAを、酸性フェノールクロロホルムで再抽出し、酢酸ナトリウム及びエタノールで沈殿させた。OLIGOTEX mRNA精製キット(QIAGEN)を用いて、ポリ(A+) RNAを単離した。

【0192】

SUPERSCRIPTプラスミドシステム (Life Technologies) の推奨プロトコルに従って、ポリ (A+) RNAを用いてcDNAを合成し、3つすべてのcDNAライブラリを作製した。これらのcDNAは、SEPHAROSE CL4Bカラム (Amersham Pharmacia Biotech) 上で分画化し、400 bpを超える大きさのcDNAをpINCY (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA) に結合した。この組み換えプラスミドを、DH5 コンピテント細胞若しくはElectroMAX 細胞 (Life Technologies) の中に導入した。

【0193】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム(Stratagene)或いは細胞溶解を利用して、in vivo切除によって宿主細胞からプラスミドを回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、及びAGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid、QIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、REAL Prep 96プラスミド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、0.1 mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4℃で保管した。

【0194】

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蛍光スキャナー(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光定量的に測定した。

【0195】

3 シークエンシング及び分析

cDNAのシークエンシング反応は、標準的な方法で、或いはABI CATALYST 800 (Perkin-Elmer) thermal cyclerまたはPTC-200 thermal cycler (MJ Research)とHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムとの組み合わせなどのハイスループット装置で行った

。cDNAのシーケンシング反応の準備には、Amersham Pharmacia Biotech社の試薬、またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(Perkin-Elmer)などのABIシーケンシングキットに含まれる試薬を用いた。cDNAのシーケンシング反応の電気泳動的な分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム(Molecular Dynamics)、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シーケンシングシステム(Perkin-Elmer)、当分野で周知のその他の配列解析システムを用いた。cDNA配列の読み枠は、標準的な方法(Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、本実施例の5に記載した方法で配列を延長した。

【0196】

cDNAのシーケンシングから得たポリヌクレオチド配列の構築及び解析は、当分野の技術者に周知のアルゴリズムを利用したソフトウェアを組合せて行った。表1は、利用したツール、ソフトウェア、アルゴリズム、それらの説明、引用文献、閾値パラメーターの概要を示す。表1の列1は用いたツール及びプログラム、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の記載部分は2つの配列の一致度の評価に用いたスコア及び確率値、他のパラメータを示す(確率値が高ければ高いほど配列間の相同性が高くなる)。配列の解析には、MACDNASIS PROソフトウェア(Hitachi Software Engineering, S. San Francisco CA)及びLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いた。

【0197】

ポリヌクレオチド配列の確証は、BLAST及び動的計画法、ジヌクレオチド最近接分析に基づいたプログラム及びアルゴリズムを用いて、ベクター及びリンカー、ポリA配列を取り除き、あいまいな塩基対をマスクすることで行った。次に、BLAST及びFASTA、BLIMPSに基づいたプログラムを用いて、公共のデータベースであるGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳類、脊椎動物、真核生物のデータベースやBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPFAMなどのデータベースから選択した配列に対してこれらの配列を問合わせて注釈を得た。Phred及びPhrap、Consedに基

づいたプログラムを用いて完全長のポリヌクレオチド配列の中にこれらの配列を構築して、BLAST及びFASTA、BLIMPSに基づいたプログラムでオープンリーディングフレームのためにスクリーンした。完全長のポリヌクレオチド配列を翻訳して対応する完全長のアミノ酸配列を引き出し、GenBankデータベース(上記)及びSwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPrositeなどのデータベース、またはPFAMなどのHidden Markov Model (HMM)に基づいたタンパク質ファミリーデータベースに対して問い合わせしてこれらの完全長の配列を分析した。HMMは、確率を利用して遺伝子ファミリーのコンセンサス一次構造を解析する(例えば、Eddy, S.R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365を参照)。

【0198】

完全長のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:4-6からのポリヌクレオチド配列の断片の同定にも使用できる。約20から4000個までのヌクレオチドの断片はハイブリダイゼーション及び増幅に有用であり、上記の発明で説明した。

【0199】

4 ノーザン分析

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織由来のRNAを結合した膜に対する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)。

【0200】

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) のようなヌクレオチドデータベース内の同一或いは関連する分子を検索する。この分析は多くの膜系ハイブリダイゼーションよりも速度が非常に速い。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、

$$(\% \text{配列同一性} \times \% \text{最大BLASTスコア}) / 100$$

として定義される積スコアである。積スコアは、2つの配列間の類似度及び配列

一致の長さの両方を考慮する。例えば、積スコア40の場合、その一致は1~2%誤差の範囲内で正確であり、70ではその一致は正確であろう。類似分子は通常、15~40の範囲の積スコアを示す分子を選択することにより同定されるが、それより低いスコアでも関連した分子が同定される場合もある。

【0201】

ノーザン分析の結果は、CAPをコードする転写物が発生したライブラリの分布割合として報告される。分析には、器官/組織及び疾患によるcDNAライブラリの分類も含まれる。器官/組織のカテゴリーには、心血管、皮膚、発生、内分泌、胃腸、造血/免疫、筋骨格、神経、生殖、泌尿器が含まれる。疾患のカテゴリーには、癌、炎症/外傷、細胞増殖、神経、貯留(pooled)が含まれる。カテゴリー別に、目的の配列を発現するライブラリの数を数えて、それを全ての範囲のライブラリの数で除した。各組織に特異的に発現する割合(パーセント)と各疾患で発現する割合は本明細書に示した。

【0202】

5 CAPをコードするポリヌクレオチドの延長

SEQ ID NO:4-6の完全長の核酸配列は、完全長分子の好適な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてその完全長分子の好適な断片を延長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の延長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の延長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア(National Biosciences)或いは他の適切なプログラムを用いて、約22個から約30個のヌクレオチドの長さで約50%以上のGC含量を有し、かつ約68~72の温度で標的配列にアニールするように設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体が生じないようにヌクレオチドを延長した。

【0203】

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

【0204】

当分野で既知の方法を利用したPCR法で高い忠実度で増幅した。PCRはPTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.)用いて96ウェルブロックプレートで行った。反応混合液は、鋳型DNA及び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ーで増幅を行った。

ステップ1	94	で3分間
ステップ2	94	で15秒
ステップ3	60	で1分間
ステップ4	68	で2分間
ステップ5	ステップ2、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ーで増幅を行った。

ステップ1	94	で3分間
ステップ2	94	で15秒
ステップ3	57	で1分間
ステップ4	68	で2分間
ステップ5	ステップ2、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。

【0205】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5 μ lの希釈していないPCR産物に溶解した100 μ l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 μ lのアリコットを1%のアガロースミニゲル上での電気泳動によって解析し、何れの反応物が配列を延長することに成功したかを決定する。

【0206】

延長したヌクレオチドを脱塩及び濃縮してから384ウェルプレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)で消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結する前に音波処理またはせん断を行った。ショットガンシーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度(0.6~0.8%)のアガロースゲル上に分離して断片を切断し、寒天をAgar ACE (Promega)で消化した。T4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いて延長したクローンをpUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)で制限部位の伸び出しを処理してコンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。

【0207】

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 $^{\circ}$ C で3分間
- ステップ2 94 $^{\circ}$ C で15秒
- ステップ3 60 $^{\circ}$ C で1分間
- ステップ4 72 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C で5分間
- ステップ7 4 $^{\circ}$ C 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)(1-15, v/v)で希釈し、DYENAMIC DIRECTキット(Amersham Pharmacia Biotech)またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycl

e sequencing ready reactionキット(Perkin-Elmer)を用いてシーケンシングした。

【0208】

同様に上述の手順で、SEQ ID NO:4 - 6のヌクレオチド配列を利用し、この延長のために設計したオリゴヌクレオチドと好適な遺伝子ライブラリを用いて5 調節配列を得た。

【0209】

6 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用

SEQ ID NO:4 - 6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、250µCiの[³²P]アデノシン三リン酸(Amersham, Chicago, IL)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NEN, Boston MA)とを組み合わせるにより標識する。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10⁷カウントの標識されたプローブを含むアリコットを、次のエンドヌクレアーゼ、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。

【0210】

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0.1×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。

【0211】

7 マイクロアレイ

化学結合方法及びインクジェット装置を用いて、基板の表面上でアレイ要素を合成することが可能である（例えば、上記Baldeschweilerを参照）。ドットプロット法またはスロットプロット法に類似したアレイを利用し、要素を熱、UV、機械的または化学的結合方法を用いて基板の表面に配置し結合させる。典型的なアレイは、手作業または利用可能な方法や機械を用いて作製することができ、任意の適正な数の要素を含み得る。ハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイズしていないプローブを取り除き、スキャナーを用いて蛍光のレベル及びパターンを決定する。スキャンした画像を分析して、マイクロアレイ上で要素にハイブリダイズする各プローブの相補性の程度及び相対的な量 / 発現レベルを調べることが可能である。

【0212】

完全長のcDNA、発現遺伝子配列断片（EST）、或いはそれらの断片が、マイクロアレイの要素を構成し得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片を、LASERGENEソフトウェア（DNASTAR）などの当分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。本発明の核酸配列の1つに対応する完全長のcDNA、EST、或いはそれらの断片、或いは本発明に関連するcDNAライブラリから任意に選択されたcDNAを、ガラススライドなどの好適な基板に整列する。cDNAは、例えばUV交差結合（UV cross-linking）を利用してスライドに固定してから、熱処理及び化学処理を施し、最後に乾燥させる（例えば、Schena, M. 他. (1995) Science 270:467-470; 及び Shalou, D. 他. (1996) Genome Res. 6:639-645を参照）。蛍光プローブを準備して、基板上の要素にハイブリダイゼーションするために用いる。上記した方法でこの基質を分析する。

【0213】

8 相補的ポリヌクレオチド

CAPをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、自然発生のCAPの発現の低下即ち阻害するために用いられる。約15～約30個の塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、より小さな或いはより大き

な配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア (National Biosciences) 及びCAP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CAPをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0214】

1.0 CAPの発現

CAPの発現及び精製は、細菌またはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でCAP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オペレーター調節要素に関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及び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CAPを発現する。真核細胞でのCAP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、CAP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、Engelhardt, 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)。

【0215】

殆どの発現系では、CAP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CAP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、市販のモノクロナール及びポリクロナール抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いた免疫親和性の精製が可能となる。6個のヒスチジン残基が連続して伸展した6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)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CAPを直接用以て以下のアッセイを行うことができる。

【0216】

1.0 機能的アッセイ

CAP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CAP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。

【0217】

遺伝子発現におけるCAPの影響は、CAPをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのどちらかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG(IgG)の保存された領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で公知の方法で細胞から精製することができる。CAP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。

【0218】

1.1 CAPに特異的な抗体の産生

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE; 例えば, Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 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CAP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。

【0219】

別法では、CAP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産生させる。C末端付近の、或いは隣接する

親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択については、当分野で周知である(例えば、前出のAusubel, 1995, 11章を参照)。

【0220】

通常、約15残基の長さのオリゴペプチドを、Applied BiosystemsのペプチドシンセサイザABI 431Aペプチドシンセサイザー(Perkin-Elmer)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CAP活性を検査するには、ペプチドまたはCAPを基板に結合し、1%BSAを用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0221】

1.2 特異的抗体を用いる自然発生CAPの精製

自然発生CAP或いは組換えCAPを、CAPに特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィーにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化SEPHAROSE(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CAP抗体とを共有結合させることにより構築する。結合の後、そのレジンを製造者の使用説明書に従って、ブロックし洗浄する。

【0222】

CAPを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、CAP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CAPとの結合を切るような条件で(例えば、pH2~3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、CAPを回収する。

【0223】

1.3 CAPと相互作用する分子の同定

CAP又は生物学的に活性なその断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬(例え

ば、Bolton 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CAPと共にインキュベートし、洗浄して、標識したCAP複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なCAP濃度で得られたデータを用いて、候補の分子とCAPとの関連、親和性、数について数値を計算する。

【0224】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行うことができるであろう。特定の好適実施例に基づいて本発明を説明したが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学或いは関連する分野の専門家には明らかな、本明細書に記載の本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲に含まれる。

【0225】

(表の簡単な説明)

表1は、CAP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、閾値パラメーターを示す。

【表1】

【表2】

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して不定の塩基をマスクするプログラム。	Perkin-Elmer 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に有用である。	Perkin-Elmer 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。	Perkin-Elmer 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つの機能がある。	Altschul, S.F.他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997)Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.	ESTs : 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列 : 確率値=1.0E-10 以下
FASTA	Pearson 及び Lipman アルゴリズムは、問合わせの配列と一群の同種の配列との類似性を検索する。FASTA は、fasta 及び tfasta、fastx、tfastx、ssearch の少なくとも5つの機能からなる。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; Pearson, W.R.(1990) Methods Enzymol. 188: 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、1つの配列と BLOCKS 及び PRINTS、DOMO、PRODOM、PFAM データベースにおける配列との一致をとり、遺伝子ファミリー及び配列相同性、構造的フィンガープリント領域を検索する。	Henikoff, S and J.G. Henikoff, Nucl. Acid. Res.,19:6565-72, 1991. J.C.; Henikoff and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, T.K.他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37: 417-424.	スコア=1000 以上 スコア/強度=0.75 以上 該当する場合、確率値=1.0E-3 以下
HMMER	PFAM のようなタンパク質ファミリーコンセンサス配列の Hidden Markov model (HMM) に基づいたデータベースの検索のためのアルゴリズムである。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol., 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L.他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322.	スコア=10-50 ビット、各タンパク質ファミリーによって異なる。

表1-2

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ProfileScan	Prosite で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列における構造及び配列のモチーフを検索するアルゴリズムである。	Gribskov, M.他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, 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 \geq 特定の Prosite モチーフに対する GCG に特異的な "HIGH" 値 通常、スコア=1.4+2.1
Phred	高い感度及び確率で自動配列決定機のトレースを調べる塩基読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 プログラムは、配列相同性の検索及びDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. 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 が構築したデータ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ャンして分泌シグナルペプチドの存在を調べる加重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 \geq 3.5 以上
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、前出; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.
 HILLMAN, Jennifer L.
 YUE, Henry
 Y. Tom Tang
 AZIMZAI, Yalda

<120> CANCER ASSOCIATED PROTEINS

<130> PF-0661 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 09/236,205
 <151> 1999-01-22

<160> 9

<170> PERL Program

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

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1518859CD1

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

```

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

```

<210> 2

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2616269CD1

<400> 2

```

Met Ala Ala Arg Glu Ser Ala Ala Arg Pro Ala Ala Gly Pro Ala
  1          5          10          15
Leu Trp Arg Leu Pro Glu Glu Leu Leu Leu Leu Ile Cys Ser Tyr

```

	20		25		30
Leu Asp Met Arg Ala	Leu Gly Arg Leu Ala	Gln Val Cys Arg Trp			
	35		40		45
Leu Arg Arg Phe Thr	Ser Cys Asp Leu Leu	Trp Arg Arg Ile Ala			
	50		55		60
Arg Ala Ser Leu Asn	Ser Gly Phe Thr Arg	Leu Gly Thr Asp Leu			
	65		70		75
Met Thr Ser Val Pro	Val Lys Glu Arg Val	Lys Val Ser Gln Asn			
	80		85		90
Trp Arg Leu Gly Arg	Cys Arg Glu Gly Ile	Leu Leu Lys Trp Arg			
	95		100		105
Cys Ser Gln Met Pro	Trp Met Gln Leu Glu	Asp Asp Ser Leu Tyr			
	110		115		120
Ile Ser Gln Ala Asn	Phe Ile Leu Ala Tyr	Gln Phe Arg Pro Asp			
	125		130		135
Gly Ala Ser Leu Asn	Arg Arg Pro Leu Gly	Val Phe Ala Gly His			
	140		145		150
Asp Glu Asp Val Cys	His Phe Val Leu Ala	Asn Ser His Ile Val			
	155		160		165
Ser Ala Gly Gly Asp	Gly Lys Ile Gly Ile	His Lys Ile His Ser			
	170		175		180
Thr Phe Thr Val Lys	Tyr Ser Ala His Glu	Gln Glu Val Asn Cys			
	185		190		195
Val Asp Cys Lys Gly	Ile Ile Val Ser Gly	Ser Arg Asp Arg			
	200		205		210
Thr Ala Lys Val Trp	Pro Leu Ala Ser Gly	Arg Leu Gly Gln Cys			
	215		220		225
Leu His Thr Ile Gln	Thr Glu Asp Arg Val	Trp Ser Ile Ala Ile			
	230		235		240
Ser Pro Leu Leu Ser	Ser Phe Val Thr Gly	Thr Ala Cys Cys Gly			
	245		250		255
His Phe Ser Pro Leu	Arg Ile Trp Asp Leu	Asn Ser Gly Gln Leu			
	260		265		270
Met Thr His Leu Gly	Ser Asp Phe Pro Pro	Gly Ala Gly Val Leu			
	275		280		285
Asp Val Met Tyr Glu	Ser Pro Phe Thr Leu	Leu Ser Cys Gly Tyr			
	290		295		300
Asp Thr Tyr Val Arg	Tyr Trp Asp Leu Arg	Thr Ser Val Arg Lys			
	305		310		315
Cys Val Met Glu Trp	Glu Glu Pro His Asp	Ser Thr Leu Tyr Cys			
	320		325		330
Leu Gln Thr Asp Gly	Asn His Leu Leu Ala	Thr Gly Ser Ser Tyr			
	335		340		345
Tyr Gly Val Val Arg	Leu Trp Asp Arg Arg	Gln Arg Ala Cys Leu			
	350		355		360
His Ala Phe Pro Leu	Thr Ser Thr Pro Leu	Ser Ser Pro Val Tyr			
	365		370		375
Cys Leu Arg Leu Thr	Thr Lys His Leu Tyr	Ala Ala Leu Ser Tyr			
	380		385		390
Asn Leu His Val Leu	Asp Phe Gln Asn Pro				
	395		400		

<210> 3

<211> 146

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 3117642CD1

<400> 3
 Met Gly Phe Leu Arg Arg Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Pro Met Ile
 1 5 10 15
 Tyr Val Glu Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asp Glu Gln Pro Asp Glu
 20 25 30
 Val Glu Ser Pro Thr Gln Ser Gln Asp Ser Thr Pro Ala Glu Glu
 35 40 45
 Arg Glu Asp Glu Gly Ala Ser Ala Ala Gln Gly Gln Glu Pro Glu
 50 55 60
 Ala Asp Ser Gln Glu Leu Val Gln Pro Lys Thr Gly Cys Glu Leu
 65 70 75
 Gly Asp Gly Pro Asp Thr Lys Arg Val Cys Leu Arg Asn Glu Glu
 80 85 90
 Gln Met Lys Leu Pro Ala Glu Gly Pro Glu Pro Glu Ala Asp Ser
 95 100 105
 Gln Glu Gln Val His Pro Lys Thr Gly Cys Glu Arg Gly Asp Gly
 110 115 120
 Pro Asp Val Gln Glu Leu Gly Leu Pro Asn Pro Glu Glu Val Lys
 125 130 135
 Thr Pro Glu Glu Asp Glu Gly Gln Ser Gln Pro
 140 145

<210> 4
 <211> 2152
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1518859CB1

<400> 4
 ctgcagcaga cggactgagt tcctctaata cctgtgttcc ttctccccc tctttctaaa 60
 acccttctct gagagaggaa taactatagc ttcagggata atatagcttt aaggaaactt 120
 ttggcagatg tggacgtcgt aacatctggg cagtgttaac agaatcccgg aggccgggac 180
 agaccaggag ccaactcgttc taggaatggt aaagtagaag gttttttcca attgatgaga 240
 ggagcagaga ggaaggagaa agaggaggag agagaaaaag ggcacaaaat accataaaac 300
 agatcccata tttctgcttc cctcacttt tagaagttaa ttgatggctg acttctgaaa 360
 gtcactttcc tttgccctgg tacttcaggc catatacatc ttttcttctc tccataatcc 420
 tccctttcaa ggatggccag tcagctaact caaagaggag ctctctttct gctgttcttc 480
 ctaactccgg cagtgcacc aacatggtat gcaggttctg gctactatcc ggatgaaagc 540
 tacaatgaag tatatgcaga ggaggtccca caggctcctg ccctggacta ccgagtcccc 600
 cgatggtggt atacattaaa tatccaggat ggagaagcca catgctactc accgaaggga 660
 ggaaattatc acagcagcct gggcacgcgt tgtgagctct cctgtgaccg gggctttcga 720
 ttgattggaa ggaggtcggg gcaatgcctg ccaagccgtc gttggtctgg aactgcctac 780
 tgcaggcaga tgagatgcca cgcactacca ttcactacta gtggcactta cacctgcaca 840
 aatggagtgc ttcttgactc tcgctgtgac tacagctggt ccagtggtta ccacctggaa 900

```

ggtgatcgca gccgaatctg catggaagat gggagatgga gtggaggcga gcctgtatgt 960
gtagacatag atcccccaa gatccgctgt ccccaactcac gtgagaagat ggcagagcca 1020
gagaaattga ctgctcgagt atactgggac ccaccgttgg tgaagattc tgctgatggt 1080
accatcacca gggtgacact tcggggccct gagcctggct ctcaacttcc cgaaggagag 1140
catgtgattc gttacactgc ctatgaccga gcctacaacc gggccagctg caagttcatt 1200
gtgaaagtac aagtggagcg ctgcccact ctgaaacctc cgcagcacgg ctacctcacc 1260
tgcacctcag cgggggacaa ctatggtgcc acctgtgaat accactgtga tggcggttat 1320
gatcgccagg ggacacctc ccgggtctgt cagtccagcc gccagtggtc aggttcacca 1380
ccaatctgtg ctccatgaa gattaacgtc aactgcaact cagctgctgg tctcttggat 1440
caattctatg agaaacagcg actcctcatc atctcagctc ctgatccttc caaccgatat 1500
tataaaatgc agatctctat gctacagcaa tccacctgtg gactggattt gcggcatgtg 1560
accatcattg aactggtggg acagccacct caggagggtg ggcgcatccg ggagcaacag 1620
ctgtcagcca acatcatcga ggagctcagg caatttcagc gcctcactcg ctctacttcc 1680
aacatggtgt tgattgacaa gcagggattt gaccgagacc gctacatgga acctgtcacc 1740
cccaggaaa tcttcacatt cattgatgac tacctactga gcaatcagga gttgaccag 1800
gctcgggagc aaaggacat atgcgagtga acttgagcca gggcatggtt aaagtcaagg 1860
gaaaagctcc tctagttagc tgaaaactgg acctaataaa aggaggaaat gttttccac 1920
agttctaggg acaggactct gaggtgggtg agtttgacaa atctgcagt gtttccaggc 1980
atccttttag gactgtgtaa tagtttccct agaagctagg tagggactga ggacaggcct 2040
tgggcagtgg gttgggggta gaagttcttc ctttctaac ccgggccctc gccagctct 2100
ccaaagtctt tcagaaaagt aaatcctaaa ttcagtgaaa aaaaaaaaaa aa 2152

```

<210> 5

<211> 1888

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2616269CB1

<400> 5

```

cacgcggtca ggcttgggccc gacatcgcgg ggacaggggt ggccatggcg gctcgggagt 60
cggtgccccg ccgggcccgg gggcctgccc tctggcgcct gccggaggag ctgctgctgc 120
tcatctgctc ctacctggac atgcccggccc tcggcgcct gccccagggtg tgccgctggc 180
tgcggcgctt caccagctgc gatctgctct ggcgcgggat agcccgggccc tcgctcaact 240
ccggcttcac gcggtcggc accgacctga tgaccagtgt cccagtgaag gaacgagtga 300
aggtgtctca gaactggaga ctggggcgct gccgagaggg gattctgctg aagtggagat 360
gcagttagat gccctggatg cagctagagg atgattctct gtacatatcc caggctaatt 420
tcatcctggc ctaccagttc cgtccagatg gtgocagctt gaatcgtcgg cctctgggag 480
tctttgctgg gcatgatgag gacgtttgcc actttgtgct ggccaactcg catattgtta 540
gtgcaggagg ggatgggaag attggcattc ataagattca cagcaccttc actgtcaagt 600
actcggctca tgaacaggag gtgaactgtg tggattgcaa agggggcatc attgtgagtg 660
gctccagggc caggacggcc aaggtgtggc ctttggcctc aggcggctg gggcagtgt 720
tacacaccat ccagactgaa gaccagctct ggtccattgc tatcagcca ttactcagct 780
cttttgtgac agggacggct tgttgcgggc acttctcacc cctgagaatc tgggacctca 840
acagtgggca gctgatgaca cacttgggca gtgactttcc cccaggggct ggggtgctgg 900
atgtcatgta tgagtcccct ttcacactgc tgtcctgtgg ctatgacacc tatgttcgct 960
actgggacct ccgaccagc gtccggaaat gtgtcatgga gtggaggag ccccacgaca 1020
gcaccctgta ctgcctgcag acagatggca accacctgct ggccacaggt tcctcctact 1080
acgggttgt acggctgtgg gaccggcgtc aaagggcctg cctgcacgcc ttcccctga 1140
cgtcactcc cctcagcagc cctgtgtact gctgcgtct caccaccaag catctctatg 1200
ctgccctgtc ttacaacctc cagctcctgg attttcaaaa cccatgaccg tcagggccac 1260
ccctgctct gggccaggga aaccagctac tcagggactt ctctgctg gagggtgcag 1320

```

```

tgatagctcc tctcactgc cccactgtgc tcctgggcoct gtgaccccag tgctcaggca 1380
ccttgcaacta gaggcttctg actcctggga ctttggagct taccagagat gcagtccttc 1440
ccaggaacct gttggagagg caggacctgc tgcttttagag tgcggctgaa cccgggctt 1500
gogtccctgt ttggccagag caagatctg gcctggagag gccatccta tacccttat 1560
tagagccatg acagcctaca gaggtaggtg aggtgctccc accttccag atggttctt 1620
tctgccctt cctggaagga aagtgaggc tgccaatagc ctctggcac cagccagacc 1680
tcacccttga ccaacctctc ggggctggg gttcattcct ggggactgt ggctgtggtt 1740
tgctttgaaa ccaagaaaga gcaaaggaa cccagcagtt ctgagtgagt tctgagccag 1800
ccctacctca ggctggctgt tgagacatgc tacaattttc atttttgtaa aaataaagct 1860
tgattgttca cagaaaaaaa aaaaaaaaa 1888

```

<210> 6
<211> 650
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3117642CB1

```

<400> 6
agctgtgaga gtgtgcagtc gcgttctctg tgtccggaca ctttttctct ctactgagac 60
tcactctgta gatccgcagg ccagtcctcc caggggctga agttgtgaaa tatgggtttt 120
ctaagaagat taatctatcg gcgtagacca atgatctatg tagaatcttc tgaggagtcc 180
agtgatgagc aacctgacga agtggaaatca ccaactcaaa gtcaggattc tacacctgct 240
gaagagagag aggatgaggg agcatctgca gctcaagggc aggagcctga agctgatagc 300
caggaactgg ttcagccaaa gactgggtgt gagcttggag atggtcctga taccaagagg 360
gtgtgcctgc gaaatgaaga gcagatgaaa ctgcccgcag aagggccaga gcctgaagcg 420
gatagccagg aacaggttca cccgaagact ggggtgtgag cgggagatgg tcttgatgtc 480
caggagttag gcctgcaaaa tccagaggag gtgaaaacac ctgaggaaga tgaagggcaa 540
tcacagcctt aaaagaagac acgctgaaat ggttcaggct gctcctgtgt tggaaatttg 600
accattaaaa ttctcccaat aaagctttac agccttctgc aaaaaaaaaa 650

```

<210> 7
<211> 464
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<300>
<308> GenBank ID No: g1345423

```

<400> 7
Met Gly Ser Pro Gly Leu Arg Pro Thr Leu Leu Leu Pro Gln Val
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu His Val Pro Pro Ser Gln Gly
20 25 30
Phe Pro Gly Ser Gly Asp Ser Pro Leu Glu Asp Asp Gly Val Trp
35 40 45
Ser Ser His Ser Leu Tyr Lys Asp Thr Pro Trp Cys Ser Pro Ile
50 55 60
Lys Val Lys Tyr Gly Asp Val Tyr Cys Arg Ala Pro Pro Gly Gly
65 70 75
Tyr Tyr Lys Thr Ala Leu Gly Thr Arg Cys Asp Ile Arg Cys Arg

```

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

<210> 8

<211> 278

```

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<308> GenBank ID No: g487348

<400> 8
Arg Gly Gly Ser Glu Gly Arg Gly Arg Gly Arg Glu Lys Arg Ala
 1          5          10          15
Arg Gly Ala Arg Arg Lys Arg Lys Gln Gly Gly Arg Glu Ala Arg
 20          25          30
Ala Ala Asp Gly Glu Gly Gly Ser Gly Pro Gly Ala Glu Ala Gly
 35          40          45
Ala Arg Thr Arg Pro Arg Glu Glu Ala Glu Gly Gly Gly Ser Val
 50          55          60
Glu Glu Gly Ala Arg Gly Ile Ile Lys Gly Asp Glu Gly Ser Val
 65          70          75
Gly Ala Gly Lys Glu Ala Gln Gly Arg Lys Tyr Gly Lys Glu Glu
 80          85          90
Trp Arg Val Arg Ala Arg Arg Arg Glu Gly Ala Arg Pro Gly Arg
 95          100         105
Val Gln Gly Gln Gly Gly Gln Val Trp Ala Tyr Ile Pro Gly Thr
 110         115         120
Gly Ala Ala Met Ala Ala Ala Ala Arg Glu Glu Glu Glu Ala
 125         130         135
Ala Arg Glu Ser Ala Ala Cys Pro Ala Ala Gly Pro Ala Leu Trp
 140         145         150
Arg Leu Pro Glu Val Leu Leu Leu His Met Cys Ser Tyr Leu Asp
 155         160         165
Met Arg Ala Leu Gly Arg Leu Ala Gln Val Tyr Arg Trp Leu Trp
 170         175         180
His Phe Thr Asn Cys Asp Leu Leu Arg Arg Gln Ile Ala Trp Ala
 185         190         195
Ser Leu Asn Ser Gly Phe Thr Arg Leu Gly Thr Asn Leu Met Thr
 200         205         210
Ser Val Pro Val Lys Val Ser Gln Asn Trp Ile Val Gly Cys Cys
 215         220         225
Arg Glu Gly Ile Leu Leu Lys Trp Arg Cys Ser Gln Met Pro Trp
 230         235         240
Met Gln Leu Glu Asp Asp Ala Leu Tyr Ile Ser Gln Ala Asn Phe
 245         250         255
Ile Leu Ala Tyr Gln Phe Arg Pro Asp Gly Ala Ser Leu Asn Arg
 260         265         270
Gln Pro Leu Gly Val Cys Trp Ala
 275

```

```

<210> 9
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<308> GenBank ID No: g3511023

```

```

<400> 9
Met Ser Trp Arg Gly Arg Ser Thr Tyr Arg Pro Arg Pro Arg Arg
 1          5          10          15
Tyr Val Glu Pro Pro Glu Met Ile Gly Pro Met Arg Pro Glu Gln
 20          25          30
Phe Ser Asp Glu Val Glu Pro Ala Thr Pro Glu Glu Gly Glu Pro
 35          40          45
Ala Thr Gln Arg Gln Asp Pro Ala Ala Ala Gln Glu Gly Glu Asp
 50          55          60
Glu Gly Ala Ser Ala Gly Gln Gly Pro Lys Pro Glu Ala Asp Ser
 65          70          75
Gln Glu Gln Gly His Pro Gln Thr Gly Cys Glu Cys Glu Asp Gly
 80          85          90
Pro Asp Gly Gln Glu Met Asp Pro Pro Asn Pro Glu Glu Val Lys
 95          100          105
Thr Pro Glu Glu Gly Glu Lys Gln Ser Gln Cys
 110          115

```

【図面の簡単な説明】

【図1A】

CAP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South, San Francisco CA) を用いて作成した。

【図1B】

CAP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South, San Francisco CA) を用いて作成した。

【図1C】

CAP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South, San Francisco CA) を用いて作成した。

【図1D】

CAP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South, San Francisco CA) を用いて作成した。

【図1E】

CAP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South, San Francisco CA) を用いて作成した。

【図1 F】

CAP-1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:1) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:4) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South, San Francisco CA) を用いて作成した。

【図2 A】

CAP-2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:5) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェアを用いて作成した。

【図2 B】

CAP-2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:5) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェアを用いて作成した。

【図2 C】

CAP-2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:5) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェアを用いて作成した。

【図2 D】

CAP-2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:5) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェアを用いて作成した。

【図2 E】

CAP-2のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:2) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:5) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェアを用いて作成した。

【図3 A】

CAP-3のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:3) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:6) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェアを用いて作成した。

【図3 B】

CAP-3のアミノ酸配列 (SEQ ID NO:3) 及び核酸配列 (SEQ ID NO:6) を示す。
このアラインメントは、MACDNASIS PROソフトウェアを用いて作成した。

【図4 A】

CAP-1(インサイト社クローン1518859; SEQ ID NO:1)とラットdrs (v-srcによってダウンレギュレートされた) 遺伝子作成物 (GI 1345423; SEQ ID NO:7) との間のアミノ酸配列アラインメントを示す。このアラインメントは、LASERGENE

ソフトウェアのマルチシーケンスアラインメントプログラム(DNASTAR, Madison WI)を用いて作成した。

【図4B】

CAP-1(インサイト社クローン1518859; SEQ ID NO:1)とラットdrs (v-srcによってダウンレギュレートされた) 遺伝子作成物 (GI 1345423; SEQ ID NO:7) との間のアミノ酸配列アラインメントを示す。このアラインメントは、LASERGENE ソフトウェアのマルチシーケンスアラインメントプログラム(DNASTAR, Madison WI)を用いて作成した。

【図5A】

CAP-2(インサイト社クローン2616269; SEQ ID NO:2)とヒトBCR遺伝子タンパク質 (GI 487348; SEQ ID NO:8) との間のアミノ酸配列アラインメントを示す。このアラインメントは、LASERGENE ソフトウェアのマルチシーケンスアラインメントプログラムを用いて作成した。

【図5B】

CAP-2(インサイト社クローン2616269; SEQ ID NO:2)とヒトBCR遺伝子タンパク質 (GI 487348; SEQ ID NO:8) との間のアミノ酸配列アラインメントを示す。このアラインメントは、LASERGENE ソフトウェアのマルチシーケンスアラインメントプログラムを用いて作成した。

【図6】

CAP-3(インサイト社クローン3117642; SEQ ID NO:3)とヒトGAGE-7前立腺腫瘍抗原 (GI 3511023; SEQ ID NO:9) との間のアミノ酸配列アラインメントを示す。このアラインメントは、LASERGENE ソフトウェアのマルチシーケンスアラインメントプログラムを用いて作成した。

【圖 1 A】

5' CTG CAG CAG ACG GAC TGA TGA GTT CCT CTA ATC CCT GTG TTC CTT CTC CCC CAT CTT 54
 TCT AAA ACC CTT CTC TGA GAG AGG AAT AAC TAT AGC TTC AGG GAT AAT ATA GCT 108
 TTA AGG AAA CTT TTG GCA GAT GTG GAC GTC GTA ACA TCT GGG CAG TGT TAA CAG 162
 AAT CCC GGA GGC CGG GAC AGA CCA GGA GCC ACT CGT TCT AGG AAT GTT AAA GTA 216
 GAA GGT TTT TTC CAA TTG ATG AGA GGA GCA GAG AGG AAG GAG AAA GAG GAG GAG 270
 AGA GAA AAA GGG CAC AAA ATA CCA TAA AAC AGA TCC CAT ATT TCT GCT TCC CCT 324
 CAC TTT TAG AAG TTA ATT GAT GGC TGA CTT CTG AAA GTC ACT TTC CTT TGC CCT 378
 GGT ACT TCA GGC CAT ATA CAT CTT TTC TTG TCT CCA TAA TCC TCC CTT TCA AGG 432
 ATG GCC AGT CAG CTA ACT CAA AGA GGA GCT CTC TTT CTG CTG TTC TTC CTA ACT 486
 M A S Q L T Q R G A L F L F L F L T

【圖 1 B】

495	CGG GCA GTG ACA CCA ACA TGG TAT GCA GGT TCT GGC TAC TAT CCG GAT GAA AGC	504	513	522	531	540
P	A V T P T P T W Y A G S G Y Y P D E S					
549	TAC AAT GAA GTA TAT GCA GAG GAG GTC CCA CAG GCT CCT GCC CTG GAC TAC CGA	558	567	576	585	594
Y	N E V Y A A E E V P Q A P A L D Y R					
603	GTC CCC CGA TGG TGT TAT ACA TTA AAT ATC CAG GAT GGA GAA GCC ACA TGC TAC	612	621	630	639	648
V	P R W C Y T L N I Q D G E A T C Y					
657	TCA CCG AAG GGA GGA AAT TAT CAC AGC AGC CTG GGC ACG CGT TGT GAG CTC TCC	666	675	684	693	702
S	P K G G N Y H S S L G G T R C E L S					
711	TGT GAC CGG GGC TTT CGA TTG ATT GGA AGG AGG TCG GTG CAA TGC CTG CCA AGC	720	729	738	747	756
C	D R G G F R L I G R R S L S V Q C L P S					
765	CGT CGT TGG TCT GGA ACT GCC TAC TGC AGG CAG ATG AGA TGC CAC GCA CTA CCA	774	783	792	801	810
R	R W S G T A Y C R Q M R C H A L P					
819	TTC ATC ACT AGT GGC ACT TAC ACC TGC ACA AAT GGA GTG CTT CTT GAC TCT CGC	828	837	846	855	864
F	I T S G T Y T C T N G V L L D S R					

【圖 1 C】


873	TGT GAC TAC AGC TGT TCC AGT GGC TAC CAC CTG GAA GGT GAT CGC AGC CGA ATC	882	891	900	909	918
C D Y S C S C S G Y H L E G D R S R I						
927	TGC ATG GAA GAT GGG AGA TGG AGT GGA GGC GAG CCT GTA TGT GTA GAC ATA GAT	936	945	954	963	972
C M E D G R G R W S G G G E P V C V D I D						
981	CCC CCC AAG ATC CGC TGT CCC CAC TCA CGT GAG AAG ATG GCA GAG CCA GAG AAA	990	999	1008	1017	1026
P P K I R C P H S R E K M A E P E K						
1035	TTG ACT GCT CGA GTA TAC TGG GAC CCA CCG TTG GTG AAA GAT TCT GCT GAT GGT	1044	1053	1062	1071	1080
L T A R V Y Y W D P P L V K D S A D G						
1089	ACC ATC ACC AGG GTG ACA CTT CGG GGC CCT GAG CCT GGC TCT CAC TTT CCC GAA	1098	1107	1116	1125	1134
T I T R V T L R G P E P G S H F P E						
1143	GGA GAG CAT GTG ATT CGT TAC ACT GCC TAT GAC CGA GCC TAC AAC CGG GCC AGC	1152	1161	1170	1179	1188
G E H V I R Y T A Y D R A Y N R A S						
1197	TGC AAG TTC ATT GTG AAA GTA CAA GTG AGA CGC TGC CCA ACT CTG AAA CCT CCG	1206	1215	1224	1233	1242
C K F I V K V Q V R R C P T L K P P						

【圖 1 D】

1251	CAG CAC GGC TAC CTC ACC TGC ACC TCA GCG GGC GAC AAC TAT GGT GCC ACC TGT	1260	1269	1278	1287	1296
Q	H G Y L T C T S A G D N Y G A T C					
1305	GAA TAC CAC TGT GAT GGC GGT TAT GAT CGC CAG GGC ACA CCC TCC CGG GTC TGT	1314	1323	1332	1341	1350
E	Y H C D G G G Y D R Q G T P S R V C					
1359	CAG TCC AGC CGC CAG TGG TCA GGT TCA CCA ATC TGT GCT CCT ATG AAG ATT	1368	1377	1386	1395	1404
Q	S S R Q W S G S G S P I C A P M K I					
1413	AAC GTC AAC GTC AAC TCA GCT GCT GGT TCA CCA CCA ATC TTTG GAT CAA TTC TAT GAG AAA CAG	1422	1431	1440	1449	1458
N	V N V N S A G A G L L D Q F Y E K Q					
1467	CGA CTC CTC ATC ATC TCA GCT CCT GAT CCT TCC AAC CGA TAT TAT AAA ATG CAG	1476	1485	1494	1503	1512
R	L L I I S A P D P S N R Y Y K M Q					
1521	ATC TCT ATG CTA CAG CAA TCC ACC TGT GGA CTG GAT TTG CGG CAT GTG ACC ATC	1530	1539	1548	1557	1566
I	S M L Q Q Q S T C G L D L R H V T I					
1575	ATT GAA CTG GTG GGA CAG CCA CCT CAG GAG GTG GGC CGC ATC CGG GAG CAA CAG	1584	1593	1602	1611	1620
I	E L V G Q Q P P Q E V G R I R E Q Q					

【 1 E 】

1629 TCA GCC AAC ATC ATC GAG GAG CTC AGG CAA TTT CAG CGC CTC ACT CGC TCC 1674
 L S A N I I E E L E L R Q F Q R L T R S
 1683 AAC ATG GTG TTG ATT GAC AAG CAG GGT ATT GAC CGA GAC CGC TAC ATG 1728
 Y F N M V L I D K Q G I D R D R Y M
 1737 GTC ACC CCC GAG GAA ATC TTC ACA TTC ATT GAT GAC TAC CTA CTG AGC 1782
 E P V T P E E I F T F I D D Y L L S
 1791 CAG GAG TTG ACC CAG CGT CGG GAG CAA AGG GAC ATA TGC GAG TGA ACT TGA 1836
 N Q E L T Q R R E R E Q R D I C E
 1845 GCA TGG TTA AAG TCA AGG GAA AAG CTC CTC TAG TTA GCT GAA ACT GGG 1890
 1899 TAA AAG GAG GAA ATG TTT TCC CAC AGT TCT AGG GAC AGG ACT CTG AGG 1944
 1953 GTG AGT TTG ACA AAT CCT GCA GTG TTT CCA GGC ATC CTT TTA GGA CTG TGT 1998
 2007 TTC CCT AGA AGC TAG GTA GGG ACT GAG GAC AGG CCT TGG GCA GTG GGT 2052

【 1 F】

2061 2070 2079 2088 2097 2106
 TGG GGG TAG AAG TTC TTC CTT TCC TAA CCC GGG CCC CTG CCC AGC TCT CCA AAG

 2115 2124 2133 2142 2151
 TCT TTC AGA AAA GTA AAT CCT AAA TTC AGT GAA AAA AAA AAA A 3'

【图 2 A】

5' CACGC GGT CAG GCT TGG GCC GAC ATC GCG GGG ACA GGG GTG GCC ATG GCG GCT CGG 56
 11 20 29 38 47 M A A R

65 74 83 92 101 110
 GAG TCG GCT GCC CGC CGG GCC GCG GGG CCT GCG CTC TGG CGC CTG CCG GAG GAG
 E S A A R P A A G P A L W R L P E E

119 128 137 146 155 164
 CTG CTG CTC ATC TGC TCC TAC CTG GAC ATG CGG GCC CTC GGC CGC CTG GCC
 L L L I C S Y L D M R A L G R L A

173 182 191 200 209 218
 CAG GTG TGC CGC TGG CTG CGG CGC TTC ACC AGC TGC GAT CTG CTC TGG CGC CGG
 Q V C R W L R R F T S C D L L W R R

227 236 245 254 263 272
 ATA GCC CGG GCC TCG CTC AAC TCC GGC TTC ACG CGG CTC GGC ACC GAC CTG ATG
 I A R A S L N S G F T R L G T D L M

281 290 299 308 317 326
 ACC AGT GTC CCA GTG AAG GAA CGA GTG AAG GTG TCT CAG AAC TGG AGA CTG GCG
 T S V P V K E R V K V S Q N W R L G

335 344 353 362 371 380
 CGC TGC CGA GAG GGG ATT CTG CTG AAG TGG AGA TGC AGT CAG ATG CCC TGG ATG
 R C R E G I L L K W R C S Q M P W M

【 2 B 】

389	CAG CTA GAG GAT GAT TCT CTG TAC ATA TCC CAG GCT AAT TTC ATC CTG GCC TAC	407	416	425	434
Q	L E D S D S L Y I S Q A N F I L A Y	407	416	425	434
443	CAG TTC CGT CCA GAT GGT GCC AGC TTG AAT CGT CGG CCT CTG GGA GTC TTT GCT	461	470	479	488
Q	R P D G A S L N R R P L G V F A	461	470	479	488
497	GGG CAT GAT GAG GAC GTT TGC CAC TTT GTG CTG GCC AAC TCG CAT ATT GTT AGT	515	524	533	542
G	H D E D V C H F V L A N S H I V S	515	524	533	542
551	GCA GGA GGG GAT GGG AAG ATT GGC ATT CAT AAG ATT CAC AGC ACC TTC ACT GTC	569	578	587	596
A	G G D G K I G I H K I H S T F T V	569	578	587	596
605	AAG TAC TCG GCT CAT GAA CAG GAG GTG AAC TGT GTG GAT TGC AAA GGG GGC ATC	623	632	641	650
K	Y S A H E Q CAG GAG GTG AAC TGT GTG GAT TGC AAA GGG GGC ATC	623	632	641	650
659	ATT GTG AGT GGC TCC AGG GAC AGG ACG GCC AAG GTG TGG CCT TTG GCC TCA GGC	677	686	695	704
I	V S G S R D R R T A K A K V W P L A S G	677	686	695	704
713	CGG CTG GGG CAG TGC TTA CAC ACC ATC CAG ACT GAA GAC CGA GTC TGG TCC ATT	722	731	740	758
R	L G Q C L H T I Q T E D R V W S I	722	731	740	758

【 2 C 】

767 GCT ATC AGC CCA TTA CTC 776 TTT TTT GTG 785 ACA GGG 794 ACG GCT TGT 803 TGC GGG CAC 812
 A I S P L L S S F V T G T A C C G H
 821 TTC TCA CCC CTG AGA ATC TGG GAC CTC AAC AGT GGG CAG CTG ATG ACA CAC TTG 866
 F S P L R I W D L N S G G Q L M T H L
 875 GGC AGT GAC TTT CCC CCA GGG GCT GGG GTG CTG GAT GTC ATG TAT GAG TCC CCT 920
 G S D F P P G A G V L D V M Y E S P
 929 TTC ACA CTG CTG TCC TGT GGC TAT GAC ACC TAT GTT CGC TAC TGG GAC CTC CGC 974
 F T L L S C G Y D T Y V R Y W D L R
 983 ACC AGC GTC CGG AAA TGT GTC ATG GAG TGG GAG GAG CCC CAC GAC AGC ACC CTG 1028
 T S V R K C V M E W E E P H D S T L
 1037 TAC TGC CTG CAG ACA GAT GGC AAC CAC CTG CTG GCC ACA GGT TCC TCC TAC TAC 1082
 Y C L Q T D G N H L L A T G S S Y Y
 1091 GGT GTT GTA CGG CTG TGG GAC CGG CGT CAA AGG GCC TGC CTG CAC GCC TTC CCG 1136
 G V V R L W D R R Q C A R A C L H A F P

【 2 D 】

1145 1154 1163 1172 1181 1190
 CTG ACG TCG ACT CCC CTC AGC AGC CCT GTG TAC TGC CTG CGT CTC ACC ACC AAG
 L T S T P L S S P V Y C L R L T T K

1199 1208 1217 1226 1235 1244
 CAT CTC TAT GCT GCC CTG TCT TAC AAC CTC CAC GTC CTG GAT TTT CAA AAC CCA
 H L Y A A L S Y N L H V L D F Q N P

1253 1262 1271 1280 1289 1298
 TGA CCG TCA GGG CCA CCC CTG CCT CTG GGC CAG GGA AAC CAG CTA CTC AGG GAC

1307 1316 1325 1334 1343 1352
 TTC TCT TGC CTG GAG GGT GCA GTG ATA GCT CCT CCT CAC TGC CCC ACT GTG CTC

1361 1370 1379 1388 1397 1406
 CTG GGC CTG TGA CCC CAG TGC TCA GGC ACC TTG CAC TAG AGG CTT CTG ACT CCT

1415 1424 1433 1442 1451 1460
 GGG ACT TTG GAG CTT ACC AGA GAT GCA GTC CCT CCC AGG AAC CTG TTG GAG AGG

1469 1478 1487 1496 1505 1514
 CAG GAC CTG CTG CTT TAG AGT GCG GCT GAA CCC GGG CCT TGC GTC CCT GTT TGG

1523 1532 1541 1550 1559 1568
 CCA GAG CAA GGA TCT GGC CTG GAG AGG CCC ATC CTA TAC CCC TTA TTA GAG CCA

1577 1586 1595 1604 1613 1622
 TGA CAG CCT ACA GAG TGA GGT GAG GTG CTC CCA CCT TCC CAG ATG GTT CCT TTC

【 2 E 】

1631 TGC CCC TTC CTG GAA GGA AAG GTG AGG CTG CCA ATA GCC TCC TGG CAC CAG CCA 1667 1676
 1685 GAC CTC ACC CTT GAC CAA CCT CTC GGG GCT GGG GGT TCA TTC CTG GGG CAC TGT 1721 1730
 1739 GGC CTG GTT TTG CTT TGA AAC CAA GAA AGA GCA AAG GGA ACC CAG CAG TTC TGA 1766 1775 1784
 1793 GTG AGT TCT GAG CCA GCC CTA CCT CAG GCT GGC TGT TGA GAC ATG CTA CAA TTT 1820 1829 1838
 1847 TCA TTT TTG TAA AAA TAA AGC TTG ATT GTT CAC AGA AAA AAA AAA AA 3' 1874 1883

【図 3 A】

5' AGC TGT GAG AGT GTG CAG TCG CGT TCC TGC TGT CCG GAC ACT TTT TTC CTC TAC 9 18 27 36 45 54
 TGA GAC TCA TCT GGT AGA TCC GCA GGC CAG TCC TCC CAG GGG CTG AAG TTG TGA 63 72 81 90 99 108
 AAT ATG GGT TTT CTA AGA AGA TTA ATC TAT CGG CGT AGA CCA ATG ATC TAT GTA 117 126 135 144 153 162
 M G F L R R R L I Y R R R P M I Y V
 GAA TCT TCT GAG GAG TCC AGT AGT GAT GAG CAA CCT GAC GAA GTG GAA TCA CCA ACT 171 180 189 198 207 216
 E S S E E S S D E E Q P D E V E S P T
 CAA AGT CAG GAT TCT ACA CCT GCT GAA GAG AGA GAG GAT GAG GGA GCA TCT GCA 225 234 243 252 261 270
 Q S Q D S T P A E E R E D E G A S A
 GCT CAA GGG CAG GAG CCT GAA GCT GAT AGC CAG GAA CTG GTT CAG CCA AAG ACT 279 288 297 306 315 324
 A Q G Q E P E A D S Q E L V Q P K T
 GGG TGT GAG CTT GGA GAT GGT CCT GAT ACC AAG AGG GTG TGC CTG CGA AAT GAA 333 342 351 360 369 378
 G C E L G D G G P D T K R V C L R N E

【 3 B 】

(105)

特表 2003 - 521876

387	GAG CAG ATG AAA CTG CCC GCA GAA GGG CCA GAG CCT GAA GCG GAT AGC CAG GAA	396	405	414	423	432
E Q M K L P A E G P E P E A D S Q E						
441	CAG GTT CAC CCG AAG ACT GGG TGT GAG CGC GGA GAT GGT CCT GAT GTC CAG GAG	450	459	468	477	486
Q V H P K T G C E R G D G P D V Q E						
495	TTG GGC CTG CCA AAT CCA GAG GAG GTG AAA ACA CCT GAG GAA GAT GAA GGG CAA	504	513	522	531	540
L G L P N P E E V K T P E D E G Q						
549	TCA CAG CCT TAA AAG AAG ACA CGC TGA AAT GGT TCA GGC TGC TCC TGT GTT GGA	558	567	576	585	594
S Q P						
603	AAT TTG ACC ATT AAA ATT CTC CCA ATA AAG CTT TAC AGC CTT CTG CAA AAA AAA	612	621	630	639	648

AA 3'

【図 4 A】

1 M A S Q L T Q R G A L F - - - L L F F L T P A V T P T W Y A 1518859
 1 M G S P G L R P T L L P Q V L L L L L A L L H V P P - - - g1345423
 28 G S G Y Y P D E S Y N E V Y A E E V P Q A P A L D Y R V P R 1518859
 28 - S Q G F P G S G D S P L E D D G V W S S H S L - Y K D T P g1345423
 58 W C Y T L N I Q D G E A T C Y S P K G G N Y H S S L G T R C 1518859
 56 W C S P I K V K Y G D V Y C R A P P G G Y Y K T A L G T R C g1345423
 88 E L S C D R G F R L I G R R S V Q C L P S R R W S G T A Y C 1518859
 86 D I R C R K G Y E L H G S S Q L V C Q S N R R W S D K V I C g1345423
 118 R Q M R C H A L P F I T S G T Y T C T N G V L L D S R C D Y 1518859
 116 K Q K R C P T L T M P A N G G F K C V D G A Y F N S R C E Y g1345423
 148 S C S S G Y H L E G D R S R I C M E D G R W S G G E P V C V 1518859
 146 Y C S P G Y T L K G E R T V T C M D N K A W S G R P A S C V g1345423
 178 D I D P P K I R C P H S R E K M A E P E K L T A R V Y W D P 1518859
 176 D M E P P R I K C P S V K E R I A E P N K L T V R V S W E T g1345423
 208 P L V K D S A D G T I T R V T L R G P E P G S H F P E G E H 1518859
 206 P E G R D T A D G I L T D V I L R G L P P G S N F P E G D H g1345423

【 4 B 】

238 V I R Y T A Y D R A Y N R A S C K F I V K V Q V R R C P T L 1518859
 236 K I E Y T V Y D R A E N K G T C K F R V K V R V R R C G K L g1345423

268 K P P Q H G Y L T C T S A G D N Y G A T C E Y H C D G G Y D 1518859
 266 N A P E N G Y M K C S S D G D N Y G A T C E F S C I G G Y E g1345423

298 R Q G T P S R V C Q S S R Q W S G S P P I C A P M K I N V N 1518859
 296 L Q G S P A R V C Q S N L A W S G T E P S C A A M N V N V G g1345423


328 V N S A A G L L D Q F Y E K Q R L L I I S A P D P S N R Y Y 1518859
 326 V R T A A A L L D Q F Y E K R R L L I V S T P T A R N L L Y g1345423

358 K M Q I S M L Q Q S T C G L D L R H V T I I E L V G Q P P Q 1518859
 356 R L Q L G M L Q Q A Q C G L D L R H I T V V E L V G V F P T g1345423

388 E V G R I R E Q Q L S A N I I E E L R Q F Q R L T R S Y F N 1518859
 386 L I G R I R A K I M P P A L A L Q L R L L R I P L Y S F S g1345423

418 M V L I D K Q G I D R D R Y M E P V T P E E I F T F I D D Y 1518859
 416 M V L V D K H G M D K E R Y V S L V T P M A L F N L I D T F g1345423


448 L L S N Q E L T Q R R E Q R D I C E 1518859
 446 P L R K E E M I L Q A E M G Q S C N T g1345423

【 5 A】

1 M - - - - - 2616269
1 R G S E G R G R G R E K R A R G A R R K R K Q G G R E A R 9487348
2 - - - - - 2616269
31 A A D G E G S G P G A E A G A R T R P R E E A E G G S V 9487348
2 - - - - - 2616269
61 E E G A R G I I K G D E G S V G A G K E A Q G R K Y G K E E 9487348
2 - - - - - 2616269
91 W R V R A R R R E G A R P G R V Q G G Q V W A Y I P G T 9487348
2 - - - - - 2616269
121 G A M A A A R E E E E E A A R E S A A R P A A G P A L W 2616269
A A R E S A A C P A A G P A L W 9487348
18 R L P E E L L L I C S Y L D M R A L G R L A Q V C R W L R 2616269
151 R L P E V L L L H M C S Y L D M R A L G R L A Q V Y R W L W 9487348
48 R F T S C D L L W R R I A R A S L N S G F T R L G T D L M T 2616269
181 H F T N C D L L R R Q I A W A S L N S G F T R L G T N L M T 9487348
78 S V P V K E R V K V S Q N W R L G R C R E G I L L K W R C S 2616269
211 S V P V K - - - V S Q N W I V G C C R E G I L L K W R C S 9487348

【図5B】

108	QMPWMQLEDDSLYISQANFILA YQFRPDGA	2616269
237	QMPWMQLEDDALYISQANFILA YQFRPDGA	g487348
138	SLNRRPLGVFAGHDEDVCFVLANSHIVSA	2616269
267	SLNRQPLGV-----C-----	g487348
168	GGDGKIGIHKIHSTFTVKYSAHEQEVNCVD	2616269
277	-----	g487348
198	CKGGIIVSGSRDR TAKVWPLASGR LGQLH	2616269
277	-----W/A-----	g487348
228	TIQTEDRVWSIAISPLLSSFTGTACC GHF	2616269
278	-----	g487348
258	SPLRIWDLNSGQLMTHLGSDFPPGAGVLDV	2616269
278	-----	g487348
288	MYESPFTLLSCGYDTYVRYWDLRTSVRKC V	2616269
278	-----	g487348
318	MEWEEPHDSTLYCCLQTDGNHLLATGSS YG	2616269
278	-----	g487348

【 5 C】

348 278	V V R L W D R R Q R A C L H A F P L T S T P L S S P V Y C L	2616269 g487348
378 278	R L T T K H L Y A A L S Y N L H V L D F Q N P	2616269 g487348

1 M G F L R R L I Y R R R R P M I Y V E S S E S S D E Q P D E 3117642
 1 M S W R G R S T Y R P R P R Y V E P P E M I G P M R P E Q 93511023
 31 V E S P T Q S Q D S T P A E E R E D E G A S A A Q G Q E P E 3117642
 31 F S D E V E P A T P E E G E P A T Q R Q D P A A A Q E G E D 93511023
 61 A D S Q E L V Q P K T G C E L G D G P D T K R V C L R N E E 3117642
 61 E G A S A G Q G P K P E A D S Q E Q G H P Q T G C E C E D G 93511023
 91 Q M K L P A E G P E P E A D S Q E Q V H P K T G C E R G D G 3117642
 91 P D G Q E M D P P N P E E V K T P E E G E K Q S Q C 93511023
 121 P D V Q E L G L P N P E E V K T P E E D E G Q S Q P 3117642
 116 93511023

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 00/01565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 7	C12N15/10 A61K38/17	C12N5/10 G01N33/50	C07K14/47 C12Q1/68
			C07K16/18 A01K67/027
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)			
IPC 7 C12N C07K A01K A61K G01N C12Q			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] EMBL ID HSZZ67198, Accession No. AA362051, 18 April 1997 (1997-04-18) ADAMS M.D. ET AL.: "EST71450 from H. sapiens, MCF7 cell line" XP002138148 encodes aa 221-275 of CAP2.		1-3, 8-17,20, 23
X	DATABASE GENBANK [Online] Accession No. AAB60391, GI 487348, 15 December 1995 (1995-12-15) CHISSOE S.L. ET AL.: "BCR gene" XP002138149 cited in the application the whole document		1-3, 8-17,20, 23

	-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.			
* Special categories of cited documents:			
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
19 May 2000		21.08.00	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Galli, I	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/01565

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 06858 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 15 April 1993 (1993-04-15) abstract -----	1-17,20, 23

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International application No.
PCT/US 00/01565

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:
Claims 16,19,22 are directed to a method of treatment of the human/animal body. If at all possible, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 18,19,21,22
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-23 partly

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: (1-23) - partly

An isolated CAP-2 polypeptide characterized by Seq. ID 2 or fragments thereof. Corresponding nucleic acids (Seq. ID 5).

Vectors, recombinant host cells, transgenic organisms, production methods, detection methods, antibodies, pharmaceutical compositions and therapeutic applications, antagonists and agonists and methods to identify them.

2. Claims: (1-23) - partly

Idem as subject-matter 1 but limited to CAP-3 (Seq. IDs 3 and 6).

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 18,19,21,22

Claims 18,19,21,22 refer to agonists and antagonists of the CAP proteins described, but do not give a true technical characterization. Moreover, no such compounds are described in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims, whose word is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/01565

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9306858 A	15-04-1993	CA 2120363 A	15-04-1993

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)	
A 6 1 P	37/02	C 0 7 K	16/32	4 C 0 8 4
C 0 7 K	14/82	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
	16/32		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
C 1 2 Q	1/68		33/53	M
G 0 1 N	33/15		33/566	
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
	33/566	A 6 1 K	37/02	
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C U , C Z , D E , D K , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z W			
(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	タング、ワイ・トム アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・ サンノゼ・ランウィックコート 4230			
(72)発明者	アジムザイ、ヤルダ アメリカ合衆国カリフォルニア州94545・ ハイワード・ロックスプリングスドライブ 2045			

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FB02 FB03 FB07
FB08
4B024 AA01 AA12 BA45 BA80 CA04
DA02 DA06 EA04 GA11 HA01
HA12
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ42 QQ52
QR56 QR82 QS34
4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19
CC24 CE13 DA05 DA08 DA14
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01
AC14 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA16 BA01 CA53
DA27 NA14 ZB07 ZB11 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA41 DA76 DA86 EA22 EA28
EA51 FA74 GA26

专利名称(译)	癌相关蛋白		
公开(公告)号	JP2003521876A	公开(公告)日	2003-07-22
申请号	JP2000594916	申请日	2000-01-21
申请(专利权)人(译)	洞察制药公司		
[标]发明人	ヒルマンジェニファーエル ユエヘンリー タングワイトム アジムザイエルダ		
发明人	ヒルマン、ジェニファー・エル ユエ、ヘンリー タング、ワイトム アジムザイ、ヤルダ		
IPC分类号	G01N33/50 A01K67/027 A61K38/00 A61K38/17 A61K45/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K14/82 C07K16/18 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/10 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P29/00 C07K14/47		
FI分类号	A61K45/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/82 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR56 4B063/QR82 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE13 4B064/DA05 4B064/DA08 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA16 4C084/BA01 4C084/CA53 4C084/DA27 4C084/NA14 4C084/ZB07 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/183027 1999-01-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码CAP的癌症相关蛋白 (CAP) 和多核苷酸。本发明还提供表达载体和宿主细胞, 抗体, 激动剂, 拮抗剂。此外, 本发明提供了一种用于诊断或治疗与CAP表达有关的疾病的方法, 以及一种用于预防其的方法。

プロシユム名	説明	引用文献	行方(ロー)情報
ABB FACCTGA	本発明において、シクラー配列を除去して不定の塩基を7つのプロシユム、	Petkau-Elimor, Applied Biosystems, Foster City, CA.	不確定
ADIPKANKEL	Protein Data Bankは、7つの異なる塩基配列の位置に塩基を指定している。	Petkau-Elimor, Applied Biosystems, Foster City, CA; Petkau et al., Pasadena, CA.	
ABI	本発明を構築するプロシユム。	Petkau-Elimor, Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABNASSASHE	Base Local Alignment Search Toolは、7つの異なる塩基配列の位置に塩基を指定している。	Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:3500-3502.	ESYs、標準=1.025以下 完全な配列、標準=1.025以下
BUNST	Person's Lipmanプログラムは、同じ配列の塩基と、非同義置換と非同義置換を区別する。ESYsは、ESYs、標準=1.025以下	Person, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; Person, W.R. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 65-88; Smith, T.F. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-490.	ESYs、標準=1.025以下 ESYs、標準=1.025以下 ESYs、標準=1.025以下
PASTA	Blocks Improved Searcherは、1.025以下とBLOCKS及びPROBS、DMMO、PRODOM PRAMデータベースにおける死亡の減少と、最近のアミノ酸及び核酸配列の、標準=1.025以下	Henikoff, S. and J.C. Henikoff, Mol. Acids Res. 1990;95:72, 1991, 41; Henikoff and S. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:1322-1332; Almond, E.L. et al. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:47-54.	ESYs、標準=1.025以下 ESYs、標準=1.025以下 ESYs、標準=1.025以下
BUMS	PRODOM PRAMデータベースにおける死亡の減少と、最近のアミノ酸及び核酸配列の、標準=1.025以下	Henikoff, S. and J.C. Henikoff, Mol. Acids Res. 1990;95:72, 1991, 41; Henikoff and S. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:1322-1332; Almond, E.L. et al. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:47-54.	ESYs、標準=1.025以下 ESYs、標準=1.025以下 ESYs、標準=1.025以下
HUMER	PRODOM PRAMデータベースにおける死亡の減少と、最近のアミノ酸及び核酸配列の、標準=1.025以下	Henikoff, S. and J.C. Henikoff, Mol. Acids Res. 1990;95:72, 1991, 41; Henikoff and S. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:1322-1332; Almond, E.L. et al. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:47-54.	ESYs、標準=1.025以下 ESYs、標準=1.025以下 ESYs、標準=1.025以下