

(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 - 527107**

(P2003 - 527107A)

(43)公表日 平成15年9月16日(2003.9.16)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 1/00	4 B 0 6 3
45/00		3/00	4 B 0 6 4
A 6 1 P 1/00		9/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全181数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 557916(P2001 - 557916)

(86)(22)出願日 平成13年2月1日(2001.2.1)

(85)翻訳文提出日 平成14年7月31日(2002.7.31)

(86)国際出願番号 PCT/US01/03455

(87)国際公開番号 W001/057085

(87)国際公開日 平成13年8月9日(2001.8.9)

(31)優先権主張番号 60/180,093

(32)優先日 平成12年2月2日(2000.2.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/182,045

(32)優先日 平成12年2月11日(2000.2.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド

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

(72)発明者 ボーグン、マライア・アール

アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・サンレアンドロ・サンティアゴロード 1424 4

(72)発明者 オウ・ヤング、ジャニス

アメリカ合衆国カリフォルニア州94005・ブリスパーン・ゴールドデンイーグルレーン 233

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Gタンパク質結合受容体

(57)【要約】

本発明は、ヒトGタンパク質結合受容体(GCREC)と、GCRECを同定及びコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニスト、およびアンタゴニストを提供する。更に、本発明は、GCRECの異常発現に関連する疾患の診断・治療・予防方法を提供する。

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 単離されたポリペプチドであって、

(a) SEQ ID NO:1乃至SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:1 - 21) からなる群から選択されたアミノ酸配列と、

(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、

(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、

(d) SEQ ID NO:1 - 21からなる群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする単離されたポリペプチド。

**【請求項2】** SEQ ID NO:1 - 21からなる群から選択された請求項1の単離されたポリペプチド。

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

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

**【請求項5】** SEQ ID NO:22 - 42からなる群から選択された請求項4の単離されたポリヌクレオチド。

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

**【請求項7】** 請求項6の組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

**【請求項8】** 請求項6の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物。

**【請求項9】** 請求項1のポリペプチドを生産する方法であって、

(a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、

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

【請求項10】 請求項1のポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項11】 単離されたポリヌクレオチドであって、

(a) SEQ ID NO:22 - 42からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と、

(b) SEQ ID NO:22 - 42からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、

(c) 前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、

(d) 前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、

(e) 前記(a)乃至(d)のRNA等価物とで構成される群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 請求項11のポリヌクレオチドの少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項13】 サンプルにおいて、請求項11に記載のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

(a) 前記サンプルをプローブでハイブリダイズするステップであって、前記プローブが、前記サンプル内の前記標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を含む少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含み、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズする、該ステップと、

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

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

【請求項15】 サンプルにおいて、請求項11のポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出する方法であって、

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

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

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

【請求項17】 前記ポリペプチドが、SEQ ID NO:1-21からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16の組成物。

【請求項18】 機能的なGCREC(新規のGタンパク質結合受容体)の発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項16の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

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

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

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

【請求項21】 機能的なGCRECの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項20の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

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

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項23】 請求項22のスクリーニング方法によって同定されたアントゴニスト化合物及び医薬的に容認できる賦形剤を含む組成物。

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

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

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

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

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

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

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

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

前記試験化合物の存在下での請求項1のポリペプチドの活性の変化が、請求項1のポリペプチドの活性を変化させる化合物の存在を示唆すること特徴とするスクリーニング方法。

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

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップと、

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

【請求項28】 試験化合物の毒性を評価する方法であって、

(a) 核酸を含む生体サンプルを前記試験化合物で処理するステップと、

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

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、

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

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

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(技術分野)**

本発明は、Gタンパク質結合受容体の核酸配列及びアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した増殖異常、神経の疾患、心血管疾患、胃腸疾患、自己免疫/炎症性の疾患、代謝障害、およびウイルス感染の診断・治療・予防に関する。本発明はさらに、Gタンパク質結合受容体の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の影響についての評価に関する。

**【0002】****(発明の背景)**

シグナル伝達は、細胞外のシグナルに細胞が応答することによる一般的なプロセスである。細胞膜を通過するシグナル伝達は、例えば、ホルモン、神経伝達物質、または成長因子などのシグナル分子が細胞膜受容体に結合することで始まる。このようにして活性化された受容体が、転写因子などの細胞内標的分子の活性化で終了する細胞内の生化学的なカスケードを引き起こす。このシグナル伝達のプロセスは、細胞増殖、分化、および遺伝子転写を含む全てのタイプの細胞機能を調節する。最も大きい遺伝子ファミリーの1つによってコードされるGタンパク質結合受容体は、細胞膜を通過する細胞外シグナルの伝達において重要な役割を演じることが分かった。GPCRは、成功した治療標的であると過去に証明された。

**【0003】**

GPCRは膜内在性タンパク質であって、1つになって逆平行ヘリックスの束を形成する7つの疎水性の膜貫通ドメインによって特徴付けられる。GPCRの大きさは、アミノ酸400以下から1000以上の範囲である(Strosberg, A. D. (1991) Eur. J. Biochem. 196 : 1-10 ; Coughlin, S. R. (1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6 : 191-197)。GPCRのアミノ末端はその長さが可変長であって細胞外に存在し、かつグリコシル化している場合が多い。カルボキシル末端は細胞質に存在し、通常はリン酸化している。細胞外ループが細胞内ループと交互し、膜貫通ドメインを繋いでいる。第2の細胞外ループと第3の細胞外ループとを連結し

ているシステインジスルフィド架橋が、アゴニストやアンタゴニストと相互作用し得る。GPCRの最も保存されたドメインは、膜貫通ドメインおよび初めの2つの細胞質ループである。膜貫通ドメインは、受容体の構造的および機能的特長に部分的に寄与している。大抵の場合、ヘリックスの束がリガンド結合ポケットを形成する。細胞外N末端セグメント、または3つの細胞外ループの内1或いは複数の細胞外ループが、リガンドとの結合に参加し得る。リガンドが結合すると、受容体は、その細胞内部分において構造変化が起こり活性化する。次に、この活性化された受容体の大きな第3の細胞内ループが、更なる細胞内のシグナル伝達作用を仲介する多量体であるグアニンヌクレオチド結合Gタンパク質複合体と相互作用する。この細胞内のシグナル伝達作用には、サイクリックAMP (cAMP)、ホスホリパーゼC、およびイノシトール三リン酸などのセカンドメッセンジャーの活性化、並びに活性化されたGPCRとイオンチャネルタンパク質との相互作用が含まれる (Watson, S. および S. Arkininstall (1994) The G-protein Linked Receptor Facts Book, Academic Press, San Diego CA, pp. 2-6 ; Bolander, F. F. (1994) Molecular Endocrinology, Academic Press, San Diego CA, pp. 162-176 ; Baldwin, J. M. (1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6 : 180-190を参照)。

#### 【0004】

GPCRには、感覚シグナルメディエータ (例えば、光および嗅覚刺激分子) と、アデノシン、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)、肝細胞成長因子、メラノコルチン、ニューロペプチドY、オピオイドペプチド、オプシン、ソマトスタチン、タキキニン、血管作用性腸管ポリペプチドファミリー、およびバソプレシンと、生体アミン (例えば、ドーパミン、エピネフリンおよびノルエピネフリン、ヒスタミン、グルタミン酸 (代謝調節効果)、アセチルコリン (ムスカリン効果)、およびセロトニン) と、ケモカインと、炎症の脂質メディエータ (例えば、プロスタグランジンおよびプロスタノイド、血小板活性化因子、およびロイコトリエン) と、ペプチドホルモン (例えば、ボンベシン、ブラジキニン、カルシトニン、C5aアナフィラトキシン、エンドセリン、卵胞刺激ホルモン (FSH)、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)、ニューロキニン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TR

H)、オキシトシン)とが含まれる。分かっていない刺激に対して受容体として作用するGPCRはオーファン受容体と呼ばれる。

#### 【0005】

GPCRファミリーの多様性は、択一的スプライシングによって更に広がる。多くのGPCR遺伝子はイントロンを含み、スプライスバリエーションが見つかったこのような受容体は現在30以上存在する。タンパク質C末端に最も多くの変異が存在する。N末端および細胞質ループにおける変異もしばしば見られるが、細胞外ループ若しくは膜貫通ドメインに於ける変異は一般的でない。受容体の中には、2ヶ所以上で変化が起こるものもある。スプライスバリエーションは、分布、シグナル伝達、結合、調節、およびリガンド結合のプロファイルから判断すると、機能的に異なっていると思われる (Kilpatrick, G. J. ら (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* 20 : 294-301)。

#### 【0006】

GPCRは、ロドプシン様受容体サブファミリー、セレクトリン様受容体サブファミリー、および代謝調節型グルタミン酸受容体サブファミリーの3つの大きなサブファミリーに分類できる。これらのGPCRサブファミリーのメンバーは、類似の機能および特徴的な7回膜貫通構造を共有するが、アミノ酸配列は多様である。最も大きなファミリーは、ホルモン、神経伝達物質、および光を含む多様な細胞外のシグナルを伝達するロドプシン様GPCRからなる。ロドプシンは、動物網膜に見られる感光性GPCRである。脊椎動物では、ロドプシン分子は、光受容(杆状体)細胞に見られる膜スタック(membranous stack)に埋め込まれている。各ロドプシン分子は光の光子に反応して、細胞膜ナトリウムチャンネルが閉止するレベルにcGMPを低下させる。このようにして、視覚シグナルが神経インパルスに変換される。他のロドプシン様GPCRは、神経伝達物質に対して直接反応する。これらのGPCRには、アドレナリンの受容体(アドレナリン受容体)、アセチルコリンの受容体(ムスカリン様受容体)、アデノシンの受容体、ガラニンの受容体、およびグルタミン酸の受容体(N-メチル-D-アスパラギン酸/NMDA受容体)が含まれる (Watson, S. および S. Arkininstall (1994) *The G-Protein Linked Receptor Facts Book*, Academic Press, San Diego CA, pp. 7-9, 19-22, 32-35, 130-131, 21

4-216, 221-222 ; Habert-Ortoli, E. ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 9780-9783を参照)。

【0007】

ガラニン受容体は、インスリン、アセチルコリン、セロトニンおよびノルアドレナリンの分泌を阻害し、プロラクチンおよび成長ホルモンの放出を刺激する神経内分泌ペプチドガラニンの活性を仲介する。ガラニン受容体は、摂食障害、苦痛、抑うつ症、およびアルツハイマー病に關与する (Kask, K. ら (1997) Life Sci. 60 : 1523-1533)。他の神経系ロドプシン様GPCRには、発生および神経病理に役割を持つと考えられるリゾホスファチジン酸および他のリゾリン脂質の受容体の増大するファミリーが含まれる (Chun, J. ら (1999) Cell Biochem. Biophys. 30 : 213-24)。

【0008】

GPCRの最も大きいファミリーである嗅覚受容体は、ロドプシン様GPCRのファミリーのメンバーでもある。これらの受容体は、匂い物質シグナルを伝達する。様々な匂いを区別するために多数の異なる嗅覚受容体が必要である。それぞれの嗅覚ニューロンは唯1種類の嗅覚受容体を発現し、異なる受容体を発現するニューロンの異なる空間領域が鼻腔に存在する。例えば、ラット脳ライブラリから単離されたRA1c受容体は、脳の特定の領域および嗅上皮の限定された領域にのみ発現することが分かった (Raming, K. ら (1998) Receptors Channels 6 : 141-151)。しかしながら、嗅覚様受容体の発現は嗅覚組織に限定されてはいない。例えば、典型的なGPCRの特徴を有する嗅覚様受容体をコードする3つのラット遺伝子は、味覚および嗅覚組織においてのみならず、男性生殖組織にも発現パターンが見られた (Thomas, M. B. ら (1996) Gene 178 : 1-5)。

【0009】

セレクチン様GPCRサブファミリーのメンバーは、リガンドとして、セレクチン、カルシトニン、グルカゴン、成長ホルモン放出ホルモン、副甲状腺ホルモン、および血管作用性小腸ペプチドなどのペプチドホルモンを有する。例えば、セレクチン受容体は、膵臓および小腸における酵素およびイオンの分泌を刺激するペプチドホルモンであるセレクチンに応答する (Watson, 前出, pp. 278-283)。

セレクチン受容体は、アミノ酸約450の長さであり、胃腸細胞の細胞膜に見られる。セレクチンがその受容体と結合すると、cAMPの産生が刺激される。

#### 【0010】

炎症反応および免疫反応に關与するセレクチン様GPCRの例には、EGFモジュールを含むムチン様ホルモン受容体 (Emr1) およびCD97受容体タンパク質がある。これらのGPCRは、最近特徴付けられたEGF-TM7受容体サブファミリーのメンバーである。これらの7回膜貫通型ホルモン受容体は、*in vivo*でヘテロ二量体として存在し、3個から7個の潜在的なカルシウム結合EGF様モチーフを含む。CD97は、主に白血球で発現され、活性化されたB細胞上およびT細胞上で著しくアップレギュレートされる (McKnight, A. J. および S. Gordon (1998) J. Leukoc. Biol. 63 : 271-280)。

#### 【0011】

第3のGPCRサブファミリーは、代謝調節型グルタミン酸受容体ファミリーである。グルタミン酸は、中枢神経系における主な興奮性神経伝達物質である。代謝調節型グルタミン酸受容体は、細胞内のエフェクターの活性を調節し、長期に亘る増強作用に關与する (Watson, 前出, p. 130)。カルシウムイオンの細胞外濃度の変化を検出するCa<sup>2+</sup>感受性受容体は、カルシウム結合に關与し得る酸性アミノ酸のクラスターを含む大きな細胞外のドメインを有する。代謝調節型グルタミン酸受容体ファミリーはまた、フェロモン受容体、GABA<sub>B</sub>受容体、および味覚受容体を含む。

#### 【0012】

他のGPCRのファミリーには、哺乳動物嗅覚受容体遺伝子に僅かに關連する線虫 (*Caenorhabditis elegans* および *Caenorhabditis briggsae*) に見られる2つの化学受容体遺伝子群を含む。細胞膜上の結合因子 (mating factor) に対する応答に關与する酵母フェロモン受容体であるSTE2およびSTE3は、粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) に由来するcAMP受容体と同様に、それら自体の7回膜貫通シグネチャ (signature) を有する、この7回膜貫通シグネチャは、個々の細胞の凝集を調節し、発生的に制御された様々な遺伝子の発現を調節すると考えられている。

## 【0013】

機能の低下や恒常的な活性を引き起こし得るGPCR変異体は、様々なヒトの疾患に関連する (Coughlin, 前出)。例えば、網膜色素変性症は、ロドプシン遺伝子の変異から生じ得る。更に、甲状腺刺激ホルモン受容体における体細胞活性化突然変異は、機能亢進性甲状腺腺腫を引き起こすと報告され、恒常的な活性を受けやすいある種のGPCRがプロトオンコジーンとして振る舞い得ることを示唆するものである (Parma, J. ら (1993) *Nature* 365 : 649-651)。黄体形成ホルモン (思春期早発症)、バソプレシンV2 (X染色体性の腎性糖尿病)、グルカゴン (糖尿病および高血圧)、カルシウム (上皮小体機能亢進症、低カルシウム尿症、高カルシウム血症)、副甲状腺ホルモン (短肢矮小発育症)、 $\beta_3$ -アドレナリン受容体 (肥満症、非インスリン依存性糖尿病)、成長ホルモン放出ホルモン (小人症)、および副腎皮質刺激ホルモン (糖質コルチコイド欠乏症) のリガンドのGPCR受容体も、ヒトの疾患に関連する変異体を含む (Wilson, S. ら (1998) *Br. J. Pharmacol.* 125 : 1387-1392 ; Stadel, J. M. ら (1997) *Trends Pharmacol. Sci.* 18 : 430-437)。GPCRもまた、抑うつ症、分裂病、不眠症、高血圧症、不安症、ストレス、腎不全、および幾つかの心血管疾患に関与する (Horn, F. および G. Vriend (1998) *J. Mol. Med.* 76 : 464-468)。

## 【0014】

加えて、GPCRを活性化する或いは抑制する数百種の新規の薬剤がこの20年間に見出された。これらの薬剤の治療標的は、癌、骨粗鬆症、および子宮内膜症はもちろん心血管、胃腸、および中枢神経系の疾患を含む疾患および障害の広い範囲に及ぶ (Wilson, 前出 ; Stadel, 前出)。例えば、パーキンソン病の治療にドーパミンアゴニストL-ドーパが用いられ、分裂病および初期のハンチントン病の治療にドーパミンアンタゴニストが用いられる。喘息、高血圧、その他の心血管疾患、および不安症の治療にアドレナリン受容体のアゴニストおよびアンタゴニストが用いられ、緑内障および頻脈の治療にムスカリン様アゴニストが用いられ、偏頭痛の治療にセロトニン5HT<sub>1D</sub>アンタゴニストが用いられ、アレルギーおよびアナフィラキシー反応、枯草熱、痒み、および動揺病にヒスタミンH<sub>1</sub>アンタゴニストが用いられる。

## 【0015】

近年の研究から、糖尿病、肥満症、および骨粗鬆症を含む代謝障害の治療において、GPCRが将来の治療薬としての可能性があることが分かった。例えば、腎性糖尿病を引き起こすV2バソプレシン受容体変異体は、突然変異を含む領域に渡るC末端V2受容体ペプチドの同時発現により、*in vitro*でその機能が助けられ得る。このことは、疾患治療の新しい方法の可能性を示している (Schoneberg, T. ら (1996) *EMBO J.* 15 : 1283-1291)。メラノコルチン-4-受容体 (MC4R) における突然変異は、ヒトの体重調節および肥満に関与する。これらのMC4R変異体は、バソプレシンV2受容体変異体と同様に、細胞膜への輸送における欠陥 (Ho, G. および R. G. MacKenzie (1999) *J. Biol. Chem.* 274 : 35816-35822) であるため、同様の方法で治療できるであろう。副甲状腺ホルモン (PTH) の1型受容体は、血流におけるカルシウム恒常性のPTH依存性の調節を仲介するGPCRである。PTHと受容体との相互作用の研究により、骨粗鬆症の治療のための新規のPTH受容体リガンドの開発が可能となるであろう (Mannstadt, M. ら (1999) *Am. J. Physiol.* 277 : F665-F675)。

## 【0016】

GPCRのケモカイン受容体群は、炎症性および感染性の疾患に用いられる潜在的な治療薬である (Locati, M. および P. M. Murphy (1999) *Annu. Rev. Med.* 50 : 425-440を参照)。ケモカインは、白血球輸送、造血、および脈管形成の調節における細胞内シグナルとして作用する小さなポリペプチドである。マウスにおいて様々な標的ケモカインを破壊する実験によって、これらの受容体が病的な炎症や多発性硬化症などの自己免疫疾患において役割を果たしていることが示された。ケモカイン受容体はまた、感染を促進するためにヘルペスウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) を含む感染因子に利用される。HIV-1によるT細胞の感染のための補助受容体として作用するケモカイン受容体CCR5の切断型がAIDSに対する抵抗性を持つようになることから、CCR5アンタゴニストがAIDSの進行の予防に有用であると考えられる。

## 【0017】

新規のGタンパク質結合受容体、およびそれらをコードするポリヌクレオチド

の発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。この新規の組成物は、増殖異常、神経の疾患、心血管疾患、胃腸疾患、自己免疫/炎症性の疾患、代謝障害、およびウイルス感染の診断・治療・予防において有用であり、また、Gタンパク質結合受容体の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の影響についての評価にも有用である。

#### 【0018】

##### (発明の要約)

本発明は、総称して「GCREC」、個別にはそれぞれ「GCREC-1」、「GCREC-2」、「GCREC-3」、「GCREC-4」、「GCREC-5」、「GCREC-6」、「GCREC-7」、「GCREC-8」、「GCREC-9」、「GCREC-10」、「GCREC-11」、「GCREC-12」、「GCREC-13」、「GCREC-14」、「GCREC-15」、「GCREC-16」、「GCREC-17」、「GCREC-18」、「GCREC-19」、「GCREC-20」、および「GCREC-21」と呼ぶGタンパク質結合受容体である精製されたポリペプチドを提供する。本発明の一実施態様では、(a) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 21とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。別法では、SEQ ID NO:1 - 21のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

#### 【0019】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたポリペプチドをコードする。別法では

、このポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択される。

【0020】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドを提供する。別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を提供する。更なる別法では、本発明は、この組換えポリヌクレオチドを含む遺伝子組換え生物を提供する。

【0021】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 21とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの生産方法を提供する。この方法は、(a) このポリペプチドの発現に好適な条件下で、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、(b) このように発現したポリペプチドを回収するステップとを含む。

【0022】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 21とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで

構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体を提供する。

【0023】

更に、本発明は、(a) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c)前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d)前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e)前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別法では、このポリヌクレオチドは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0024】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(b) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c)前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d)前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e)前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、(a)前記サンプル内の標的ポリヌクレオチドと相補的な配列を構成する少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むプローブと前記サンプルをハイブリダイズさせるステップであって、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片とでハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする、該ステップと、(b)前記ハイブリダイゼーション複合体の存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。別法では、前記プローブは、少なくとも60個の連続するヌクレオチドを含む。

【0025】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌク

レオチド配列と、(b) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と90%以上の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(c)前記(a)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(d)前記(b)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(e)前記(a)乃至(d)のRNA等化物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプルにおいて検出する方法を提供する。この方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて、前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するステップと、(b)増幅された前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在するか否かを検出し、存在する場合には随意選択でその収量を測定するステップとを含む。

#### 【0026】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 21とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含む効果的な量のポリペプチド及び好適な医薬用賦形剤を含む組成物を提供する。一実施例では、SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は、患者にこの組成物を投与することを含む、機能的GCREC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。

#### 【0027】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 21とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a)

このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b)このサンプルのアゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的GCREC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。

【0028】

更に、本発明は、(a)SEQ ID NO:1-21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b)SEQ ID NO:1-21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c)SEQ ID NO:1-21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d)SEQ ID NO:1-21とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドのアンタゴニストとして効果的な化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a)このポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b)このサンプルのアンタゴニスト活性を検出するステップとを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアンタゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的GCREC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。

【0029】

更に本発明は、(a)SEQ ID NO:1-21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b)SEQ ID NO:1-21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c)SEQ ID NO:1-21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d)SEQ ID NO:1-21とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、(a)このポリペプチドを好適な条件下で少なくとも1つの化合物と結合させるステップと、(b)このポリペプチドとこの試験化合物との結合を検出して、このポリペプチド

と特異的に結合する化合物を同定するステップとを含む。

【0030】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と、(b) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有する天然のアミノ酸配列と、(c) SEQ ID NO:1 - 21からなる一群から選択されたアミノ酸配列の生物学的に活性な断片と、(d) SEQ ID NO:1 - 21とからなる一群から選択されたアミノ酸配列の免疫原性断片とで構成される一群から選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) このポリペプチドを、その活性が許容される条件下で少なくとも1つの化合物と結合させるステップと、(b) この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性を評価するステップと、(c) この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性と、この試験化合物の不在下でのこのポリペプチドの活性とを比較するステップとを含み、この試験化合物の存在下でのこのポリペプチドの活性の変化が、このポリペプチドの活性を調節する化合物の存在を示唆するという特徴を有する。

【0031】

更に本発明は、SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択された配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、(a) この標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、(b) この標的ポリヌクレオチドの発現の変化を検出するステップとを含む、該スクリーニング方法を提供する。

【0032】

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

ップとを含み、前記処理した生体サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の収量の差異が試験化合物の毒性を示唆する。この方法における前記プローブは、(1) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3) 前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4) 前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5) 前記(1)乃至(4)のRNA等価物とで構成される一群から選択されたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの連続する少なくとも20個のヌクレオチドを含む。また、前記ハイブリダイゼーションは、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われる。また、前記標的ポリヌクレオチドが、(1) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と、(2) SEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択されたポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列と、(3) 前記(1)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(4) 前記(2)に相補的なポリヌクレオチド配列と、(5) 前記(1)乃至(5)のRNA等価物とを含む。代替的に前記標的ポリヌクレオチドは前記ポリヌクレオチド配列の断片である。

#### 【0033】

(本発明の記載について)

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

#### 【0034】

本明細書及び請求の範囲において単数形を表す「或る」、「その(この等)」は、文脈で明確に示していない場合は複数形を含むことに注意されたい。従って

、例えば「或る宿主細胞」は複数の宿主細胞を含み、その「抗体」は複数の抗体は含まれ、当業者には周知の等価物なども含まれる。

#### 【0035】

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

#### 【0036】

(定義)

用語「GCREC」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GCRECのアミノ酸配列を指す。

#### 【0037】

用語「アゴニスト」は、GCRECの生物学的活性を強める、或いは模倣する分子を指す。このアゴニストは、GCRECに直接相互作用するか、或いはGCRECが関与する生物学的経路の成分と作用して、GCRECの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

#### 【0038】

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

## 【0039】

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

## 【0040】

用語「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、或いはそれらの任意の断片を指し、天然の分子及び合成分子を含む。「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子の配列を指す場合、「アミノ酸配列」及び類似の用語は、アミノ酸配列を記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

## 【0041】

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。

## 【0042】

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

#### 【0043】

用語「抗体」は、抗原決定基と結合可能なFab及びF(ab')<sub>2</sub>、及びそれらの断片、Fv断片などの無傷の分子を指す。GCRECポリペプチドと結合する抗体は、抗体を免疫する小ペプチドを含む無傷の分子またはその断片を用いて作製可能である。動物（例えば、マウス、ラット、若しくはウサギ）を免疫化するのに使用されるポリペプチド或いはオリゴペプチドは、RNAの翻訳から、或いは化学的に合成可能であり、必要に応じて担体タンパク質と結合させることも可能である。ペプチドと化学的に結合した一般に用いられる担体は、ウシ血清アルブミン、チログロブリン、及びキーホールリンペットヘモニアン（KLH）を含む。次ぎに、この結合したペプチドを用いて動物を免疫化する。

#### 【0044】

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。

#### 【0045】

本明細書において「アンチセンス」は、特定の核酸配列のセンス（コーディング）鎖と塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。アンチセンス成分には、DNAと、RNAと、ペプチド核酸（PNA）と、ホスホロチオネートやメチルホスホネート、ベンジルホスホネート（benzylphosphonate）などの修飾された骨格（backbone linkage）を有するオリゴヌクレオチドと、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖などの修飾された糖を有するオリゴヌクレオチドと、5-メチルシトシンまたは2'-deoxyuracil、7-deaza-2'-deoxyguanosineなどの修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドを含み得る。アンチセンス分子は、化学合成や

転写を含む任意の方法で作ることができる。相補的アンチセンス分子は、一度細胞に導入されると、細胞によって作られた天然の核酸配列と塩基対となって二重鎖を形成し、転写や翻訳を阻害する。「負」または「マイナス」という表現はアンチセンス鎖であり、「正」または「プラス」という表現はセンス鎖である。

【0046】

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

【0047】

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

【0048】

「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。GCREC若しくはGCREC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。

【0049】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット（PE Biosystems, Foster City CA）を用いて5'及び/または3'の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、またはGEL

VIEW 断片構築システム (GCG, Madison, WI) またはPhrap (University of Washington, Seattle WA)等の断片構築用のコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上の重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長及び重複の両方によって構築されるコンセンサス配列もある。

【0050】

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。

【0051】

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。

【0052】

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。

【0053】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成し得る、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合或いは非共有結合するレポーター分子や酵素を指す。

【0054】

用語「断片」は、GCRCまたはGCRC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。

#### 【0055】

SEQ ID NO:22 - 42の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO:22 - 42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:22 - 42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:22 - 42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:22 - 42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。

#### 【0056】

SEQ ID NO:1 - 21のある断片は、SEQ ID NO:22 - 42のある断片によってコードされる。SEQ ID NO:1 - 21のある断片は、SEQ ID NO:1 - 21を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO:1 - 21のある断片は、SEQ ID NO:1 - 21を特異的に認識する抗体の開発における免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO:1 - 21の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に決定できる。

#### 【0057】

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

#### 【0058】

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

#### 【0059】

ポリヌクレオチド配列についての用語「パーセントの同一性」または「%の同

一性」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる、2つ以上のポリヌクレオチド配列間の一致する残基の百分率のことである。このようなアルゴリズムは、標準化され再現できる方法で、2つの配列間のアラインメントを最適化するべく、配列にギャップを挿入して、より意味をもつ2つの配列間の比較を行うことができる。

#### 【0060】

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

#### 【0061】

別法では、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)が提供する、広く用いられている無料の配列比較アルゴリズム一式が、NCBI (Bethesda, MD) を含む幾つかのソース及びインターネット (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) で入手可能である。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いられる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールが入手可能であり、2つのヌクレオチド配列の対を直接比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html>にアクセスして、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び bla

stp (以下に記載) の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、デフォルトを設定するギャップ及び他のパラメータと共に用いられる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較する場合、ある者は、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (April-21-2000)でblastnを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

**【0062】**

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。

**【0063】**

高い同一性を示さない核酸配列でも、遺伝子コードの縮重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。

**【0064】**

ポリペプチド配列に用いられる用語「パーセントの同一性」または「%の同一性」とは、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされる2つ以上の

ポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は周知である。アラインメント方法の中には、保存的なアミノ酸置換を考慮したものもある。詳細に上述したこのような保存的な置換は、一般に、置換部位の電荷や疎水性が保存され、ポリペプチドの構造（従って機能も）が保存される。

#### 【0065】

ポリペプチド配列間の同一性のパーセントは、MEGALIGN バージョン3.12e配列アラインメントプログラム（上記）に組込まれるCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパラメータを用いて決定可能である。CLUSTAL Vを用いる対方式のポリペプチド配列のアライメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、及び「diagonals saved」=5と設定する。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、アラインメントされたポリペプチド配列の対の同一性のパーセントは、「類似性のパーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

#### 【0066】

別法では、NCBI BLASTソフトウェア一式が用いられる。例えば、2つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (Apr-21-2000)でblastpを使用するであろう。そのようなデフォルトパラメータは、例えば、以下のようにする。

#### 【0067】

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。

【0068】

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

【0069】

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。

【0070】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。特異的なハイブリダイゼーションとは、2つの核酸配列が高い相同性を有することを意味する。アニーリングが許容される条件下で、特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成され、洗浄過程の後もハイブリダイズしたままである。洗浄過程は、ハイブリダイゼーションプロセスの厳密性即ちストリンジェンシー(stringency)の決定において特に重要であり、よりストリンジェントな条件では、非特異的な結合、即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合が減少する。核酸配列間のアニーリングが許容される条件は、当業者によって日常的に決定され、ハイブリダイゼーションの間は一定であるが、洗浄過程は、目的のストリンジェンシーにするためにその最中に条件の変更が可能であり、ハイブリダイゼーション特異性が得られる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が68℃で、約6×SSC、約1%(w/v)のSDS、並びに約100 µg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0071】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、洗浄過程を行う際

の温度によっても左右される。この洗浄温度は通常、所定のイオン強度とpHにおける特定の配列の熱融点( $T_m$ )より約5~20℃低く選択される。この $T_m$ は、(所定のイオン強度とpHの下)標的の配列の50%が完全に一致するプローブとハイブリダイズする温度である。 $T_m$ を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーションの条件は、周知であり、Sambrook, J. 他による, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版の1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainville NY; 特に2巻の9章に記載されている。

#### 【0072】

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

#### 【0073】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合によって、形成された2つの核酸配列の複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は溶液中(例えば、 $C_0t$ または $R_0t$ 分析)で形成されるか、或いは溶液中の1つの核酸配列と固体の支持物(例えば、紙、膜、フィルタ、チップ、ピン、或いはスライドガラス、または細胞及びその核酸を固定する任意の適当な基板)に固定されたもう一つの核酸配列とで形成され得る。

#### 【0074】

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。

【0075】

「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。

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ上に固有の指定された位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0079】

用語「調節」は、GCRECの活性の変化を指す。例えば、調節によって、GCREC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。

【0080】

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

## 【0081】

「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。

## 【0082】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリシンで終わるアミノ酸残基のペプチド骨格に結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。この末端のリシンにより、この組成物が溶解性となる。PNAは、相補的な一本鎖DNAやRNAに優先的に結合して転写物の伸長を止め、ポリエチレングリコール化して細胞における寿命を延ばし得る。

## 【0083】

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

## 【0084】

「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、GCRECやそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードする核酸配列のことである。プローブは、検出可能な標識またはレポーター分子が結合され単離されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドである。典型的な標識には、放射性アイソトープ及びリガンド、化学発光試薬、酵素がある。「プライマー」とは、相補的な塩基対を形成して標的のポリヌクレオチドにアニーリング可能な、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーがポリヌクレオチドにアニーリングした後、あるDNAポリメラーゼ酵素によって、標的のDNA一本鎖に沿って伸長される。プライマーの組は、例えば、PCR法における核酸配列の増幅(及び同定)に用いることができる。

## 【0085】

本発明に用いられるプローブ及びプライマーは、既知の配列の少なくとも15の連続するヌクレオチドを含む。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。

## 【0086】

プローブ及びプライマーの準備及び使用方法については、例えば、Sambrook, J.他による、1989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。

## 【0087】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドは、当分野で周知の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 MA1より入手可能)によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ(mispriming library)」を入力できる。また、Primer3は、特にマイクロアレイのオリゴヌクレオチドの選択に有用である(後の方の2つのプライマー選択プログラムのソースコードは、それぞれのソースから得ることができ、ユーザーのニーズを満たすように変更することもできる)。PrimerGenプログラム(UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UKより入手可能)は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計するため、アラインメントされた核酸配列の最も保存された領域或いは最も保存されていない領域のどちらかとハイブリダイズするプライマーを選択することができる。従って、このプログラムは、固有及び保存されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記した任意の選択方法で同定されたオリゴヌクレオチドやポリヌクレオチドの断片は、例えば、PCR法やシーケンシングプライマー、マイクロアレイエレメント、或いはサンプルの核酸の完全或いは部分的に相補的なポリヌクレオチドを同定する特定のプローブなどの、ハイブリダイゼーション技術に有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記した方法に制限されるものではない。

#### 【0088】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグメントを人工的に組み合わせた配列である。この人工の組み合わせは、化学合成によって作られる場合も多いが、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。

#### 【0089】

別法では、このような組換え核酸は、この組換え核酸を発現する哺乳動物のワ

クチン接種に用いると、その哺乳動物の防衛的な免疫応答を誘発する、ワクシニアウイルスに基づいたウイルスベクターの一部であり得る。

【0090】

「調節エレメント」は、通常は遺伝子の非翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の非翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写や翻訳、またはRNAの安定性を調節する宿主またはウイルスタンパク質と相互作用する。

【0091】

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

【0092】

本明細書において、DNA配列に対する「RNA等価物」とは、基準となるDNA配列と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる。

【0093】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。GCREC、GCRECをコードする核酸、またはその断片を含むと推定されるサンプルは、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリント等を含み得る。

【0094】

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。

【0095】

用語「実質的に精製された」は、自然の環境から取り除かれてから、単離或いは分離された核酸配列或いはアミノ酸配列であって、自然に結合している組成物が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましくは90%以上除去されたものを指す。

【0096】

「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。

【0097】

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、膜及びフィルム、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、毛细管が含まれる。この基板には、壁または塹壕、ピン、チャンネル、細孔などの様々な表面形態があり、そこにポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0098】

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

【0099】

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

らに、限られた時間に一時的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

#### 【0100】

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

#### 【0101】

特定の核酸配列の「変異配列」とは、デフォルトパラメータ設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastnによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定の核酸配列の同一性が、少なくとも40%と決定された核酸配列のことである。このような核酸の対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。ある変異配列は、例えば、「アレル」変異配列(上述)または「スプライス」変異配列、「種」変異配列、「多型」変異配列と表すことができる。スプライス変異配列は基準分子と同一性が極めて高い可能性があるが、mRNAプロセッシング中のエキソンの択一的スプライシングによってポリヌクレオチドの数が多くなったり、少なくなったりする。対応するポリペプチドは、基準分子に存在する追加の機能ドメインを有したり、基準分子に存在するドメインが欠落したりし得る。種変異配列は、種によって異なるポリヌクレオチド配列である。得られるポリペプチドは、互いに高いアミノ酸同一性を有する。多型変異配列は、所定の種と種における特定の遺伝子のポリ

ヌクレオチド配列が異なる。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の1つのヌクレオチドが異なる「1ヌクレオチド多型」(SNP)も含み得る。SNPの存在は、例えば、或る集団、病態、病態の性向を示唆し得る。

#### 【0102】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、デフォルトパラメータ設定の「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9 (May-07-1999)を用いるblastpによって、ある核酸配列のある長さに対する該特定のポリペプチド配列の同一性が、少なくとも40%と決定されたポリペプチド配列のことである。このようなポリペプチドの対は、ある長さにおいて、例えば、少なくとも50%または60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、或いはそれ以上の同一性を示し得る。

#### 【0103】

(発明)

本発明は、新規のヒトGタンパク質結合受容体(GCREC)及びGCRECをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、これらの組成物を利用した増殖異常、神経の疾患、心血管疾患、胃腸疾患、自己免疫/炎症性の疾患、代謝障害、およびウイルス感染の診断、治療、及び予防に関する。

#### 【0104】

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

#### 【0105】

表2は、GenBankタンパク質(genept)データベースにおいてBLAST解析により

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

#### 【0106】

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

#### 【0107】

表4に示されているように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列、またはゲノムDNA由来のコード (エキソン) 配列、或いはこれらの2種類の配列のあらゆる組み合わせを用いて組み立てた。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列識別番号 (Polynucleotide SEQ ID NO : ) およびそれに対応するインサイトポリヌクレオチドコンセンサス配列番号 (Incyte Polynucleotide ID) を示す。列3は、塩基対における各ポリヌクレオチド配列の長さを示す。列4は、例えば、SEQ ID NO:22 - 42を同定するため、或いはSEQ ID NO:22 - 42と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用なポリヌクレオチド配列の断片

を示す。列5は、cDNA配列、ゲノムDNAから推定されるコード配列（エキソン）、および/またはcDNAおよびゲノムDNAの両方からなる群に対応する識別番号を示す。これらの配列を用いて本発明の完全長ポリヌクレオチド配列を組み立てた。表4の列6および列7はそれぞれ、列5の配列に対応するcDNA配列およびゲノム配列の開始ヌクレオチド（5'）位置および終了ヌクレオチド（3'）位置を示す。

#### 【0108】

表4の列5に示されている識別番号は、具体的には、例えばインサイトcDNAおよびそれらに対応するcDNAライブラリの識別番号を示す。例えば、5080262H1はインサイトcDNA配列の識別番号であり、LNODNOT11はそれが由来するcDNAライブラリの識別番号である。cDNAライブラリが示されていないインサイトcDNAは、プールされているcDNAライブラリ（例えば、SBSA02572V1）に由来する。または、列5の識別番号は、ポリヌクレオチド配列の組み立てに用いたGenBankのcDNAすなわちEST（例えば、g4589483）の識別番号の場合もある。または、列5の識別番号は、Genscan分析によって推定されるゲノムDNAのコード領域の場合もある。例えば、GNN.g5902227\_030は、Genscan推定コード配列の識別番号であって、g5902227がGenscan分析によって得られたGenBankの配列の識別番号である。このGenscan推定コード配列は、配列を組み立てる前に編集する場合がある（実施例4を参照）。または、列5の識別番号は、“exon-stitching”アルゴリズムによってcDNAおよびGenscan推定エキソンの両方からなる群の場合もある（実施例5を参照）。または、列5の識別番号は、“exon-stretching”アルゴリズムによってcDNAおよびGenscan推定エキソンの両方からなる群の場合もある（実施例5を参照）。場合によっては、列5に示されている配列の範囲と重複するインサイトcDNAの範囲が得られ、最終的なコンセンサス配列が決定されるが、それに相当するインサイトcDNAの識別番号は示されていない。

#### 【0109】

表5は、インサイトcDNA配列を用いて組み立てられたこれらの完全長ポリヌクレオチド配列が由来する代表的なcDNAライブラリを示す。代表的なcDNAライブラリとは、上記ポリヌクレオチド配列の組み立ておよび決定に用いられたインサイ

トcDNA配列を最も多く含むインサイトcDNAライブラリのことである。表5に示されているcDNAライブラリを作製するために用いた組織およびベクターが表6に示されている。

#### 【0110】

本発明はまた、GCRECの変異体も含む。好適なGCRECの変異体は、GCREC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GCRECアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

#### 【0111】

本発明はまた、GCREC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、GCRECをコードするSEQ ID NO:22 - 42からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。配列表に示したSEQ ID NO:22 - 42のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖の背骨がデオキシリボースではなくリボースからなる等価RNA配列を含む。

#### 【0112】

本発明はまた、GCREC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、GCREC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%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:22 - 42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%のポリヌクレオチド配列同一性を有するSEQ ID NO:22 - 42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、GCREC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。

#### 【0113】

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

#### 【0114】

GCRECをコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は一般に、好適に選択されたストリンジェントな条件下で、天然のGCRECのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然のコドンを含めるなどの実質的に異なった使い方のコドンを有するGCREC或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作るとは有利となり得る。特定のコドンが宿主によって利用される頻度に基づいてコドンを選択して、ペプチドの発現が特定の真核細胞または原核宿主に発生する割合を高めることが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えないで、GCREC及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に変更する別の理由は、天然の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備えるRNA転写物を作ることにある。

#### 【0115】

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

#### 【0116】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO:22 - 42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 En*

zymol. 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。

#### 【0117】

当分野で周知のDNAのシーケンシング方法を用いて、本発明の何れの実施例も実行可能である。この方法には、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech Piscataway NJ)、或いはELONGASE増幅システム(Life Technologies, Gaithersburg MD)にみられるような校正エキソヌクレアーゼとポリメラーゼとの組み合わせなどの酵素が用いられる。好ましくは、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200 Thermal Cycler200 (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800 (PE Biosystems) などの装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373或いは377 DNAシーケンシングシステム(PE Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム(Molecular Dynamics, Sunnyvale CA)または当分野で周知の他の方法を用いてシーケンシングを行う。得られた配列を当分野で周知の様々なアルゴリズムを用いて分析する(例えば、Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7; Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley CH, New York NY, pp. 856-853.を参照)。

#### 【0118】

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、GCRECをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなどの上流にある配列を検出する。例えば制限部位PCR法を利用する1つの方法では、一般的なプライマー及び入れ子プライマー (nested primer) を用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する(例えば、Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2:318-322を参照)。逆PCR法を用いる別法では、広範な方向に伸長して環状化した鋳型から未知の配列を増幅するプライマーを用いる。この鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限断片に由来する(例えば、Triglia, T.ら (1988) Nucleic Acids Res 16:8186

を参照)。キャプチャPCR法を用いる第3の方法は、ヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片のPCR増幅を含む(例えば、Lagerstrom, M.他(1991) PCR Methods Applic 1:111-119を参照)。この方法では、多数の制限酵素による消化及びライゲーションを用いて、PCRを行う前に未知の配列の領域の中に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、当分野で周知の別の方法を用いて未知の配列を得ることも可能である。(例えば、Parker, J.D. 他(1991) Nucleic Acids Res. 19:3055-3060を参照)。更に、PCR、ネスト化プライマー、PROMOTERFINDERライブラリ(Clontech, Palo Alto CA)を用いれば、ゲノムDNA内の歩行が可能である。この方法ではライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を探すのに有用である。全てのPCR法をベースにした方法では、プライマーは、市販のOLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムなどを用いて、長さが22~30ヌクレオチド、GC含量が50%以上、約68~72の温度で鋳型に対してアニーリングするよう設計される。

#### 【0119】

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

#### 【0120】

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

である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しない場合もあるDNAの小片のシーケンシングに特に適している。

#### 【0121】

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

#### 【0122】

種々の目的でGCRECをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシング及び/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。ランダムな断片によるDNAの混合や遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドのPCR再組み立てを用いて、ヌクレオチド配列の組換えが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド媒介性定方向突然変異誘発を利用して、新しい制限部位を生成する突然変異の導入、グリコシル化パターンの変更、コドン選択の変更、スプライスバリエーションの作製等が可能である。

#### 【0123】

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、GCREC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GCRECの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャフリングは、PCR法による遺伝子断片の組換えで遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。次に、このライブラリを、目的の特性を有する遺伝子変異体を同定するために選択或いはスクリーニングする。これらの好ましい変異体をプールし、DNAシャフリング及び選択/スクリーニングを繰り返す。

返す。従って、人工的な育種及び急速な分子の進化によって多様な遺伝子が作られる。例えば、ランダムな位置に変異がある1つの遺伝子の断片を、目的の特性が最適化するまで、組換え及びスクリーニング、シャフリングを実施することもできる。別法では、所定の遺伝子の断片を、同じ或いは異なった種の同じ遺伝子ファミリーの相同な遺伝子の断片で組換え、それによってプロトコルに従った調節可能な方法で、多数の天然遺伝子の遺伝子多様性を最大にすることができる。

#### 【0124】

別の実施例によれば、GCRECをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である(例えば、Caruthers, M.H.ら(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser 7:215-223; 及びHorn, T.他(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser.225-232を参照)。別法として、化学的方法を用いてGCREC自体またはその断片を合成することが可能である。例えば、ペプチド合成は種々の固相技術を用いて実行可能である(例えば、Creighton, T. (1984) *Proteins. Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, pp. 55-60; Roberge, J.Y.ら(1995) *Science* 269:202-204を参照)。また、合成の自動化は例えばABI 431Aペプチドシンセサイザー(PE Biosystems)を用いて達成し得る。更にGCRECのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

#### 【0125】

このペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィー(例えば、Chiez, R.M. 及び F.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421を参照)を用いて実質的に精製可能である。合成されたペプチドの組成は、アミノ酸分析或いはシーケンシングにより確認することができる(例えば、Creighton、前出、pp28-53を参照)。

#### 【0126】

生物学的に活性なGCRECを発現させるために、GCRECをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入する。この発現ベクターは、

好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要なエレメントを含む。これらのエレメントには、ベクター及びGCRECをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このようなエレメントは、その長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、GCREC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。GCRECをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれなければならない。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、自然及び合成の様々なものから得ることが可能である。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。(例えば、Scharf, D. 他 (1994) Results Probl. Cell Differ. 201 - 18-162.を参照)。

#### 【0127】

当業者に周知の方法を用いて、GCRECをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる。(例えば、Sambrook, J. 他. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4章及び8章, 及び16-17章; 及び Ausubel, F.M. 他. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9章及び13章1 - 4章を参照)。

#### 【0128】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、GCRECをコードする配列の保持及び発現が可能である。これらには、限定するものではないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物や、酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌や、ウイルス発現ベ

クター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）または細菌発現ベクター（例えば、TiまたはpBR322プラスミド）で形質転換された植物細胞系や、動物細胞系などが含まれる（例えば、前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. および S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509、Engelhard, E.K. 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945、Takamatsu, N. (1987) EMBOJ. 6:307-311; The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196、Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J.J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355を参照)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる (Di Nicola, M. 他 (1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356、Yu, M. 他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344、Buller, R.M. 他(1985) Nature 317(6040):813-815; McGregor, D.P. 他(1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226、Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 389:239-242等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

#### 【0129】

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、GCREC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、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT(Stratagene, La Jolla CA)またはpSPORT 1 プラスミド(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GCREC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GCRECが必要な場合は、GCREC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。

#### 【0130】

GCRECの発現に酵母の発現系の使用が可能である。因子やアルコールオキシダーゼやPGHプロモーターなどの構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多種のベクターが、酵母菌サッカロミセス - セレビジエまたは*Pichia pastoris*に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。(例えば、Ausubel, 1995,前出、Bitter, G.A. ら (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544、及びScorer, C. A. ら (1994) *Bio/Technology* 121 - 181-184.を参照)。

#### 【0131】

植物系もGCRECの発現に使用可能である。GCRECをコードする配列の転写は、例えば、CaMV由来の35S及び19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターが単独で、或いはTMV(例えば、Coruzzi, G. ら. (1984) *EMBO J.* 3 : 1671-1680 ; Broglie, R. ら (1984) *Science* 224 : 838-843 ; および Winter, J. ら (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17 : 85-105を参照)由来のオメガリーダー配列と組み合わせて促進される。これらの作製物は、直接のDNA形質転換或いは病原体を介したトランスフェクションによって、植物細胞の中に導入可能である。(例えば、*The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology* (1992) McGraw Hill NY, pp.191-196を参照)。

#### 【0132】

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GCREC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GCREC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。

#### 【0133】

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)。

#### 【0134】

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

#### 【0135】

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<sup>r</sup>またはapr<sup>r</sup>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(chlorsulfuron)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(phosphinotricin acetyltransferase)に対する耐性を与える(例えば、Wigler, M. 他.(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 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)。アミノシアニン、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)。

#### 【0136】

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、GCREC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、GCREC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GCREC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。

#### 【0137】

一般に、GCRECをコードする核酸配列を含み、GCREC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。

#### 【0138】

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GC REC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。GC REC上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ (two-site, monoclonal-based immunoassay) が好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びその他のアッセイは、当分野では十分に知られている。(例えば、Hampton, R. 他.(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual. APS Press, St Paul, MN, Sect. IV; Coligan, J. E. 他 Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York, NY; 及び Pound, J.D. (1990) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ)。

#### 【0139】

種々の標識技術及び結合技術が当業者には周知であり、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイに用いられ得る。GC REC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、GC REC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。

#### 【0140】

GCRECをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でのこのタンパク質の発現及び回収に好適な条件下で培養される。形質転換された細胞から産生されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用されるその配列及び/またはそのベクターによる。GCREC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GCREC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。

#### 【0141】

更に、挿入した配列の発現調節能力または発現したタンパク質を所望の形にプロセシングする能力によって宿主細胞株が選択される。このようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化 (lipidation)、及びアシル化が含まれるが、これらに限定されるものではない。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断する翻訳後のプロセシングを利用して、標的タンパク質、折りたたみ及び/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための特定の細胞装置及び特徴のある機構をもつ種類の宿主細胞 (例えば、CHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38) が American Type Culture Collection (ATCC; Bethesda, MD) より入手可能であり、外来のタンパク質の正しい修飾及びプロセシングを確実にするために選択される。

#### 【0142】

本発明の別の実施例では、GCREC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 GCRECタンパク質が、GCREC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、GCREC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、GCREC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。

#### 【0143】

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GCREC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、<sup>35</sup>S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。

#### 【0144】

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

#### 【0145】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドやその断片などのGCRECの天然のリガンド、または天然の基質、構造的または機能的な擬態性

または自然結合パートナーに密接に関連している (Coligan, J.E. 他 (1991) Current Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様に、化合物は、GCRECが結合する天然受容体、或いは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体のある断片に密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。一実施例では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてGCRECを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、大腸菌からの細胞が含まれる。GCRECを発現する細胞またはGCRECを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、GCRECまたは化合物の何れかの結合、刺激または阻害を分析する。

#### 【0146】

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

#### 【0147】

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

セイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、GCRECの活性を調整する試験化合物は間接的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つから複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

#### 【0148】

別の実施例では、胚性幹細胞（ES細胞）における相同組換えを用いて動物モデル系内で、GCRECまたはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ノックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である（米国特許第5,175,383号及び第5,767,337号等を参照）。例えば129/SvJ細胞株等のマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292）等のマーカー遺伝子で破壊した目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。別法では、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をノックアウトする（Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330）。形質転換したES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス系等から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、潜在的な治療薬や毒性薬剤で検査することができる。

#### 【0149】

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

#### 【0150】

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

#### 【0151】

（治療）

GCRECのある領域とGタンパク質結合受容体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。従って、GCRECは、増殖異常、神経の疾患、心血管疾患、胃腸疾患、自己免疫/炎症性の疾患、代謝障害、およびウイルス感染においてある役割を果たすと考えられる。GCREC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、GCRECの発現または活性を低下させることが望ましい。また、GCREC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、GCRECの発現または活性を増大させることが望ましい。

#### 【0152】

従って、一実施例において、GCREC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GCRECまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には増殖異常、神経の疾患、心血管疾患、胃腸疾患、自己免疫/炎症性の疾患、代謝障害、およびウイルス感染が含まれ、増殖異常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、神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー及びクロイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、Gerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、中枢神経系性精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分性及び不安性の障害、分裂病性疾患を含む精神病と、季節性障害 (SAD) と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥーレット病と、進行性核上麻痺、皮質基部変性 (corticobasal degeneration) 及び家族性の前頭側頭性健忘症とが含まれ、心血管疾患の中には、動静脈瘤、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、静脈奇形、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍や、血栓崩壊、バルーン血管形成術 (balloon angioplasty)、血管置換術、および大動脈冠動脈バイパス術移植手術の合併症や、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化 (mitral annular calcification)、僧帽弁脱出、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、及び心臓移植の合併症が含まれ、胃腸疾患の中には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞ま

たは幽門の浮腫、腹部アングナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、及び後天性免疫不全症候群（AIDS）腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、肝炎、肝脂肪症、血色素症、ウィルソン病、 $\alpha$ -1-アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌とが含まれ、自己免疫/炎症性の疾患の中には、炎症及び日光性角化症、後天性免疫不全症候群（AIDS）及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ（AP EGED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、原発性血小板血症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、代謝障害の中には、糖尿病、肥満症、および骨粗鬆症などが含まれ、感染症の中には、アデノウイルス及びアレナウイルス、ブンヤウイルス、カリチウイルス、コロナウイルス、フィロウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、フラビウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポーウイルス、パラミキソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、ラブドウイルス、トガウイルスに分類されるウイルス

病原体による感染が含まれる。

【0153】

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GCREC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、GCREC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。

【0154】

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

【0155】

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GCREC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、GCREC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。

【0156】

更なる実施例では、GCREC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GCREC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、上記した増殖異常、神経の疾患、心血管疾患、胃腸疾患、自己免疫/炎症性の疾患、代謝障害、およびウイルス感染が含まれる。一実施態様では、GCREC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GCREC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。

【0157】

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

【0158】

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。

#### 【0159】

GCREC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GCREC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GCRECと特異的に結合するものを同定が可能である。GCREC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。

#### 【0160】

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、GCREC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-Guérin) 及びCorynebacterium parvumが特に好ましい。

#### 【0161】

GCRECに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、または断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなり、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。これらのオリゴペプチド或いはペプチド、

またはそれらの断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であることが望ましい。GCRECアミノ酸の短いストレッチは、KLHなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

#### 【0162】

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

#### 【0163】

更に、「キメラ抗体」作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる(例えば、Morrison, S.L.他. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81-4851-4855; Neuberger, M.S.他. (1984) Nature 312:604-608; Takeda, S.ら. (1985) Nature 314:452,454を参照)。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、GCREC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)。

#### 【0164】

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

#### 【0165】

GCRECに対する特異的な結合部位を含む抗体も得ることができる。例えば、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって生成されるF(ab')に断片と、F(ab')に断片のジスルフィド架橋を減じることによって生成されるFab断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。別法では、Fab発現ライブラリを作製することによって、所望の特異性とモノクローナルFab断片の迅速且つ容易な同定が可能となる(例えば、Huse, W.D. ら. (1989) Science 254:1275-1281を参照)。

#### 【0166】

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、GCREC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GCREC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)。

#### 【0167】

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、GCREC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GCREC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GCREC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、GCREC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GCREC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、GCREC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、GCREC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, D

C; Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0168】

ある下流での適用におけるこのような医薬品の品質及び適性を調べるために、ポリクローナル抗体医薬の抗体価及び結合活性を更に評価する。例えば、少なくとも1~2mg/mlの特異的な抗体、好ましくは5~10mg/mlの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体医薬は一般に、GCREC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)。

【0169】

本発明の別の実施例では、GCRECをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列が、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、GCRECをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子(DNA及びRNA、修飾ヌクレオチド)を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片が、GCREC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。

【0170】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に送達することができる(例えば、Slater, J.E. 他(1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475; and Scanlon, K.J. 他(1995)9(13):1288-1296.を参照)。また、アンチセンス配列は、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる(例えば、Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271; Ausubel, 前出; Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347を参照)。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロ

ープ、及び当分野で周知のその他の系が含まれる (Rossi, J.J. (1995) Br. Med. Bull. 51(1):217-225; Boado, R.J.他 (1998) J. Pharm. Sci. 87(11):1308-1315; and Morris, M.C. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25(14):2730-2736.を参照)。

#### 【0171】

本発明の別の実施例では、GCRECをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療は、(i) 遺伝子欠損症 (例えば、X染色体連鎖遺伝 (Cavazzana-Calvo, M. 他 (2000) Science 288:669-672) によって特徴づけられる重度の複合型免疫欠損 (SCID) -X1)、遺伝性アデノシン - デアミナーゼ (ADA) 欠損症 (Blaese, R.M. 他 (1995) Science 270:475-480; Bordignon, C. 他 (1995) Science 270:470-475) に関連する重度の複合型免疫欠損、嚢胞性繊維症 (Zabner, J. 他 (1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G. 他 (1995) Hum. Gene Therapy 6:643-666; Crystal, R.G. 他. (1995) Hum. Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア (thalassamia)、家族性高コレステロール血症、第VIII因子若しくは第IX因子欠損による血友病 (Crystal, R.G. (1995) Science 270:404-410; Verma, I.M. and Somia. N. (1997) Nature 389:239-242) を治療したり、(ii) 条件的致死性遺伝子産物 (例えば、細胞増殖の制御不能による癌の場合) を発現させたり、及び (iii) 細胞内の寄生虫 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) (Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396; Poeschla, E. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399) や、B型若しくはC型肝炎ウイルス (HBV、HCV)、*Candida albicans* 及び *Paracoccidioides brasiliensis* 等の真菌寄生虫、*Plasmodium falciparum* 及び *Trypanosoma cruzi* 等の原虫寄生体) に対する防御機能を有するタンパク質を発現させて行うことができる。GCRECの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からGCRECを発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

#### 【0172】

本発明の更なる実施例では、GCRECの欠損による疾患や異常症は、GCRECをコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によっ

てGCREC欠損細胞に導入することによって治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的な導入技術には、(i) 個々の細胞内へのDNAのマイクロインジェクション、(ii) 金粒子の打ち込み、(iii) リポソーム仲介性トランスフェクション、(iv) 受容体仲介性遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポゾン (Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217; Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. and H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450) の使用が含まれる。

#### 【0173】

GCRECの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) が含まれる。GCRECを発現させるために、(i) 恒常的に活性なプロモーター (例えば、サイトメガロウイルス (CMV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ (TK)、若しくは - アクチン遺伝子等)、(ii) 誘導性プロモーター (例えば、市販されているT-REXプラスミド (Invitrogen) に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター (Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551; Gossen, M. 他 (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、エクジソン誘導性プロモーター (市販されているプラスミドPVGRXR及びPINDに含まれている: Invitrogen)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター (Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 前出)、または(iii) 正常な個体に由来するGCRECをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

#### 【0174】

市販のリポソーム形質転換キット (例えば、Invitrogenが販売しているPERFECT LIPID及びTRANSFECTION KIT) を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能である。別法で

は、リン酸カルシウム法 (Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) *Virology* 52:456-467) 若しくは電気穿孔法 (Neumann, B. 他 (1982) *EMBO J.* 1:841-845) を用いて形質転換を行う。初代細胞にDNAを導入するためには、これらの標準的な哺乳動物トランスフェクションプロトコルを変更する必要がある。

【0175】

本発明の別の実施例では、GCRECの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i) レトロウイルス末端反復配列 (LTR) プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でGCRECをコードするポリヌクレオチドと、(ii) 好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii) 追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコーディング配列を伴うRev応答性エレメント (RRE) とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター (例えば、PFB及びPFBNE0) はStratagene社から入手可能であり、公表データ (Riviere, I. 他. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:6733-6737) に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。このベクターは、VSVg (Armentano, D. 他 (1987) *J. Virol.* 61:1647-1650; Bender, M.A. 他 (1987) *J. Virol.* 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) *J. Virol.* 62:3802-3806; Dull, T. 他 (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Zufferey, R. 他 (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880) 等の乱交雑エンベロープタンパク質若しくは標的細胞上の受容体に対する親和性を有するエンベロープ遺伝子を発現する好適なベクター産生細胞系 (VPCL) において増殖される。RIGGに付与された米国特許第5,910,434号 (「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」) において、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、ある細胞集団 (例えば、CD4<sup>+</sup> T細胞) の形質導入、並びに形質導入した細胞を患者に戻す方法は、遺伝子治療の分野では周知であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. 他. (1997) *J. Virol.* 71:7020-7029; Bauer, G. 他 (1997) *Blood* 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) *J. Virol.* 71:4707-4716; Ranga, U. 他 (1998) *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290 )。

【0176】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、GCRECの発現に関連する1 或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にGCRECをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングは当分野では周知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を脾臓の無損傷の脾島の中に導入するために可変性であることが証明された (Csete, M.E. 他. (1995) Transplantation 27:263-268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターが、米国特許第5,707,618号(「Adenovirus vectors for gene therapy」)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについてはまた、Antinozzi, P.A. 他 (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544; and Verma, I.M. and N. Soymia (1997) Nature 18:389:239-242を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0177】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、GCRECの発現に関連する1 或いは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にGCRECをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス(HSV)系のベクターは、HSV親和性の中枢神経細胞にGCRECを導入する際に特に重要である。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは当分野では周知である。複製適格性の単純疱疹ウイルス(HSV) I型系のベクターは、霊長類の眼にレポーター遺伝子を送達するために用いられてきた (Liu, X. 他 (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製は、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号(Herpes simplex virus swains for gene transfer)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために、好適なプロモーターのコントロールの下で、細胞に導入される少なくとも1つの内在性遺伝子を含むゲノムからなる組換えHSV d92についての記載がある。また上記特許には、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV株

の作製及び使用方法が開示されている。HSVベクターについては、Goins, W.F. 他 (1999) J. Virol. 73:519-532 and Xu, H. 他 (1994) Dev. Biol. 163:152-161を参照し、引用することをもって本明細書の一部とする。クローニングされたヘルペスウイルス配列の操作や、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドをトランスフェクトした後の組換えウイルスの継代、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は当分野で周知の技術である。

#### 【0178】

別法では、ウイルス（正の一本鎖RNAウイルス）ベクターを用いてGCRECをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス（Semliki Forest Virus, SFV）の生物学的な研究が広範に行われ、遺伝子伝達ベクター（gene transfer vector）がSFVゲノムに基づいていることが分かった（Garoff, H. and K.-J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9:464-469）。ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスカプシドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。このサブゲノムRNAが完全長のゲノムRNAより高いレベルで複製されるため、酵素活性（例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ）を有するウイルスタンパク質に対してカプシドタンパク質が過剰に産生される。同様に、GCRECをコードする配列をウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のGCRECをコードするRNAが産生され、高いレベルでGCRECが合成される。通常は

ウイルス感染は2～3日以内の細胞溶解に関係するが、シンドビスウイルス（SIN）の変異体を有するハムスターの正常な腎細胞（BHK-21）の持続的な感染を確立する能力は、ウイルスの溶解性の複製が遺伝子治療に適用できるように好適に変更することが可能であることを示唆している（Dryga, S.A. 他. (1997) *Virology* 228 :74-83）。様々な宿主にウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にGCRECを導入することができる。ある集団における細胞のサブセットの特定の形質導入には、形質導入する前に細胞のソーティングを必要とする場合がある。ウイルスの感染性cDNAクローンの操作、ウイルスcDNA及びRNAのトランスフェクション、並びにウイルスの感染方法は当分野で周知である。

## 【0179】

例えば開始部位から約 - 10 から約 + 10 までの転写開始部位に由来するオリゴヌクレオチドを用いて、遺伝子の発現を阻害することが可能である。同様に、三重らせん塩基対合法を用いて阻害することができる。三重らせん構造は、二重らせんがポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合のために十分に広がるのを阻止するため有用である。三重式DNAを用いる最近の治療の進歩は文献に記載されている（例えば、Gee, J.E. ら. (1994) In: Huber, B.E. 及び B.I. Carr, Molecular and 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。

## 【0180】

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、GCREC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。

## 【0181】

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

## 【0182】

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GCRECをコードするDNA配列の転写によって生成され得る、このようなDNA配列はT7またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモータを用いて、種々のベクターの中に組み入れることが可能である。別法では、相補的なRNAを構成的または誘導的に合成するこれらのcDNA作製物は、細胞株、細胞、または組織の中に導入することができる。

#### 【0183】

RNA分子を修飾することによって、細胞内の安定性を高め、半減期を長くすることができる。可能な修飾には、分子の5'及び/または3'端部でのフランキング配列の追加、または分子のバックボーン内のホスホジエステル結合の代わりにホスホチオネートまたは2' Oメチルを用いる修飾が含まれるが、これらに限定されるものではない。PNAの生成に固有のこの概念は、内在性のエンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンのアセチル -、メチル -、チオ -、及び同様の修飾形態だけでなく、イノシン、キューエオシン (queosine)、及びワイプトシン (wybutosine) などの従来のものでない塩基を含めることによって、これらの分子の全体に拡大することができる。

#### 【0184】

本発明の更なる実施例は、GCRECをコードするポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。特定のポリヌクレオチドの発現の変化に有効な化合物には、限定するものではないが、特定のポリヌクレオチド配列と相互作用可能な非高分子化学物質、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子やその他のポリペプチド転写調節因子が含まれる。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビター或いはエンハンサーとして作用し、ポリヌクレオチドの発現を変化させ得る。従って、GCRECの発現または活性の増加に関連する疾患の治療においては、GCRECをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有用であり、GCREC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、GCRECをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物

が治療上有用であり得る。

【0185】

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

## 【0186】

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

## 【0187】

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。

## 【0188】

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

## 【0189】

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

## 【0190】

肺投与用の組成物は、液状または乾燥粉末状に調製することができる。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば、従来の低分子量有機薬剤）の場合には、速効製剤のエアロゾル輸送が当分野で周

知である。高分子（例えばより大きなペプチドやタンパク質）の場合には、肺の肺胞領域を介する肺輸送の技術が近年向上したため、インスリン等の薬剤を実際に血中に輸送することが可能となった（Patton, J.S. 他, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射を用いなくて投与できるという点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーが必要でなくなる。

#### 【0191】

本発明に用いる好適な組成物には、目的を達成するため、効果的な量の活性処方成分を含む組成物が含まれる。当業者は、十分に自身の能力で効果的な服用量を定めることができる。

#### 【0192】

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

#### 【0193】

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

#### 【0194】

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GCRECまたはその断片、GCRECの抗体、GCRECのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。薬用有効度及び毒性は、たとえば、ED<sub>50</sub>（服用に対して集団の50%に医薬的效果がある用量）またはLD<sub>50</sub>（服用に

対して集団の50%に致命的である用量)統計を計算するなど、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって決定することができる。毒性効果と治療効果との薬用量比は治療指数であり、 $LD_{50} / ED_{50}$ と示すことができる。

高い治療指数を示す組成物が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータが、ヒトへの適用のために、薬用量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる薬用量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、 $ED_{50}$ を含む血中濃度の範囲であることが望ましい。薬用量は、用いられる投与形態及び患者の感受性、投与の経路によって、この範囲内で様々である。

#### 【0195】

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

#### 【0196】

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

#### 【0197】

(診断)

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

#### 【0198】

GCREC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GCREC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GCREC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GCREC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GCRECの発現の量、制御及び疾患、生検組織からのサンプルが基準値と比較される。基準値と被験者との間の偏差が、診断の指標となる。

#### 【0199】

本発明の別の実施例によれば、GCREC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、疾患と関連し得るGCREC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、GCRECの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のGCREC値の調節を監視する。

#### 【0200】

一実施形態では、GCREC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、GCREC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GCREC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。

#### 【0201】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、GCREC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:22-42の配列、或いはGCREC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。

#### 【0202】

GCREC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、GCREC及びGCREC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<sup>32</sup>P 或いは<sup>35</sup>S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。

#### 【0203】

GCRECをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、GCRECの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、このような疾患には増殖異常、神経の疾患、心血管疾患、胃腸疾患、自己免疫/炎症性の疾患、代謝障害、およびウイルス感染が含まれ、増殖異常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、神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血

管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患と、クールー及びクロイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、Gerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫 (cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、中枢神経系性精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分性及び不安性の障害、分裂病性疾患を含む精神病と、季節性障害 (SAD) と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥーレット病と、進行性核上麻痺、皮質基部変性 (corticobasal degeneration) 及び家族性の前頭側頭性健忘症とが含まれ、心血管疾患の中には、動静脈瘤、アテローム硬化、高血圧、脈管炎、レイノー病、静脈奇形、動脈解離、静脈瘤、血栓静脈炎及び静脈血栓、血管の腫瘍や、血栓崩壊、バルーン血管形成術 (balloon angioplasty)、血管置換術、および大動脈冠動脈バイパス術移植手術の合併症や、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性2尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化 (mitral annular calcification)、僧帽弁脱出、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性エリテマトーデスの心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、及び心臓移植の合併症が含まれ、胃腸疾患の中には、嚥下障害、消化性食道炎、食道痙攣、食道狭窄、食道癌、消化不良、消化障害、胃炎、胃癌、食欲不振、悪心、嘔吐、胃不全麻痺、洞または幽門の浮腫、腹部アンギナ、胸焼け、胃腸炎、イレウス、腸管感染、消化性潰瘍、胆石症、胆嚢炎、胆汁うっ滞、膵臓炎、膵臓癌、胆道疾

患、肝炎、高ビリルビン血症、硬変症、肝臓の受動性うっ血、ヘパトーム、感染性大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、クローン病、ホイップル病、マロリー  
ヴァイス症候群、結腸癌、結腸閉塞、過敏性腸症候群、短小腸症候群、下痢、便秘、胃腸出血、及び後天性免疫不全症候群（AIDS）腸症、黄疸、肝性脳症、肝腎症候群、肝炎、肝脂肪症、血色素症、ウィルソン病、 $\alpha$ -1-アンチトリプシン欠損症、ライ症候群、原発性硬化性胆管炎、肝梗塞、門脈循環閉塞及び血栓、小葉中心壊死、肝臓紫斑病、肝静脈血栓、肝静脈閉塞症、子癇前症、子癇、妊娠性急性肝脂肪、妊娠性肝臓内胆汁うっ滞と、結節性再生及び腺腫、癌腫を含む肝癌とが含まれ、自己免疫/炎症性の疾患の中には、炎症及び日光性角化症、後天性免疫不全症候群（AIDS）及び副腎機能不全、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ（APECED）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、腓炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、原発性血小板血症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、代謝障害の中には、糖尿病、肥満症、および骨粗鬆症などが含まれ、感染症の中には、アデノウイルス及びアレナウイルス、ブニヤウイルス、カリチウイルス、コロナウイルス、フィロウイルス、ヘパドナウイルス、ヘルペスウイルス、フラビウイルス、オルソミクソウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、パラミキソウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、ラブドウイルス、トガウイルスに分類されるウイルス病原体による感染が含まれる。MADをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系

の技術、PCR法、ディップスティック (dipstick)、ピン (pin)、ELISA式アッセイ、及び変異GCREC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。

#### 【0204】

ある実施態様では、GCREC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。GCRECをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件の下、患者から採取した体液或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。好適な培養期間の後、サンプルを洗浄し、シグナルを定量して基準値と比較する。患者のサンプルのシグナルの量が、制御サンプルと較べて著しく変わっている場合は、サンプル内のGCREC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。

#### 【0205】

GCRECの発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロファイルが確立される。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件の下、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、GCRECをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な被験者から得た値と周知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが用いられる実験からの値とを比較することによって定量可能である。正常なサンプルから得た標準的な値を、疾患の症状を示す被験者から得た値と比較可能である。基準値と被験者の値との偏差を用いて罹患しているかどうかを決定する。

#### 【0206】

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。

【0207】

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。

【0208】

GCREC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GCRECをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはGCRECをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件の下、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェントな条件の下、近縁のDNA或いはRNA配列の検出及び/または定量のため用いることが可能である。

【0209】

或る実施態様において、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、一塩基多型(SNP)を検出し得る。SNPは、ヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となる場合が多いヌクレオチドの置換、挿入及び欠失である。限定するものではないが、SNPの検出方法には、一本鎖立体構造多型(SSCP)及び蛍光SSCP(fSSCP)法が含まれる。SSCPでは、GCRECをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)でDNAを増幅する。このDNAは、例えば病変或いは正常な組織、生検サンプル、体液等に由来し得る。このDNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR産物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。この差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光標識することによって、DNAシーケンシング装置などのハイス

ループット機器でアンプリマー (amplimer) の検出をすることが可能になる。更に、インシリコSNP (in silico SNP : isSNP) と呼ばれる配列データベース分析法は、共通のコンセンサス配列の構築に用いられる個々の重複するDNA断片の配列を比較することによって、多型を同定することができる。これらのコンピュータベースの方法は、DNA配列クロマトグラムの自動分析及び統計モデルを用いたシーケンシングエラーや研究室でのDNAの調整に起因する配列のばらつきを排除する。別法では、例えばハイスループットのMASSARRAYシステム (Sequenom, Inc., San Diego CA) を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

#### 【0210】

GCRECの発現を定量するために用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識或いはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification)、及び標準的な曲線に結果が加えられたものが含まれる (例えば、Melby, P.C.ら(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-44 ; Duplaa, C.ら(1993) Anal. Biochem. 229-236を参照)。多数のサンプルの定量速度は、ハイスループット型のアッセイを用いることで速くなるであろう。このアッセイでは、目的のオリゴマーやポリヌクレオチドが様々な希釈液中に含まれ、分光光度法或いは非色応答によって定量が迅速である。

#### 【0211】

更に別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド配列に由来するオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおける標的として用いることができる。マイクロアレイを、上記したように多数の遺伝子の相対的な発現レベルを同時にモニタリングする転写イメージング技術に用いることができる。マイクロアレイはまた、遺伝子変異、突然変異及び多型の同定に用いることができる。この情報を用いて、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を解明し、疾患を診断し、遺伝子発現に関連する疾病の進行/後退をモニタリングし、疾患の治療における治療薬の開発や活性のモニタリングを行うことができる。特に、患者にとって最適かつ有効な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを作成することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づいて、患者に対して極めて効果的でありながら副作用

を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

#### 【0212】

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

#### 【0213】

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

#### 【0214】

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

#### 【0215】

本発明のポリヌクレオチドの発現プロファイルを示す転写イメージはまた、合成化合物または天然化合物の毒性試験のみならず、*in vitro* モデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用され得る。全ての化合物は、作用及び毒性の機構を示唆する、頻繁に分子フィンガープリント若しくは毒性シグネチャ (signature)

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

#### 【0216】

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

#### 【0217】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞型のプロテ

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

#### 【0218】

プロテオームのプロファイルは、GCRECに特異的な抗体を用いてGCREC発現レベルを定量することによっても作成可能である。或る実施例では、マイクロアレイ上のエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝露して各アレイエレメントへのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する(Lueking, A. ら. (1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Mendoza, L.G. ら. (1999) Biotechniques 27:778-788)。検出は当分野で既知の様

々な方法で行うことができ、例えば、チオール反応性またはアミノ反応性蛍光化合物を用いてサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

#### 【0219】

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

#### 【0220】

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

#### 【0221】

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

。

## 【0222】

当分野で周知の方法でマイクロアレイを準備して使用し、分析する。(例えば、Brennan, T.M. 他 (1995) 米国特許第5,474,796号; Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:10614-10619; Baldeschweiler 他(1995) PCT出願番号W095/251116; Shalon, D.他 (1995) PCT出願番号W095/35505; Heller, R.A. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94:2150-2155; 及び Heller, M.J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが周知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。また、この文献を引用することを以って本明細書の一部とする。

## 【0223】

本発明の別の実施例ではまた、GCRECをコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製することが可能である。コーディング配列または非コーディング配列の何れかを用いることができるが、或る例では、コーディング配列より非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー間にコーディング配列が保存されていることにより、染色体マッピング時に望ましくない交差ハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。この配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工の染色体、例えば、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる(Harrington, J.J. ら (1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154等を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて、例えば病状の遺伝と特定の染色体領域やまたは制限断片長多型(RFLP)の遺伝とが相関するような遺伝子連鎖地図を作成可能である(Lander, E.S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。

## 【0224】

in situ蛍光ハイブリダイゼーション(FISH)は、他の物理的及び遺伝子地図データと相関し得る(例えば、Heinz-Ulrich, 他による(1995) in Meyers, 前出,

pp. 965-968を参照)。遺伝子地図データの例は、種々の科学誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のワールドワイドウェブのサイトで見つけることができる。物理的な染色体地図上のGCRECをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、このような疾患と関連するDNA領域の決定に役立つため、更なる位置を決定するクローニングが行われる。

#### 【0225】

染色体標本のin situハイブリダイゼーション、及び確定した染色体マーカーを用いた結合分析などの物理的マッピング技術を用いて、遺伝子地図を拡張することもできる。マウスなどの別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置させることにより、たとえ正確なヒト染色体の位置が分かっていなくても、関連するマーカーが明らかになる場合が多い。この情報は、位置クローニング或いは別の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患の研究をしている研究者にとって価値がある。疾患や症候群に關与する1つ或いは複数の遺伝子の位置が、例えば血管拡張性失調症の11q22-23などの特定の遺伝子領域に遺伝子結合によって大まかに決定されると、その領域に対するどの配列マッピングも、さらなる調査のための関連する遺伝子或いは調節遺伝子を表す(例えば、Gatti, R.A.他による(1988) Nature 336:577-580を参照)。また、目的の本発明のヌクレオチド配列を用いて、正常者、保有者、即ち感染者の間、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。

#### 【0226】

本発明の別の実施例では、GCREC、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。GCREC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。

#### 【0227】

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、GCREC、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GCRECが、当分野で周知の方法で検出される。精製されたGCREC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。

#### 【0228】

別の実施例では、GCRECと結合可能な中和抗体がGCREC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、GCREC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。

#### 【0229】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にGCREC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。

#### 【0230】

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。

#### 【0231】

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第60/180,093号、および同第60/182,045号に言及することをもって本明細書の一部とする。

#### 【0232】

(実施例)

#### 1 cDNAライブラリの作製

インサイトcDNAはLIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA)に含まれているcDNAライブラリに由来し、表4の列5に示されている。組織の一部をホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解する一方、この組織の別の一部をホモジナイズしてフェノールに溶解するか、或いはTRIzol (Life Technologies)、グアニジニウムイソチオシアネート及びフェノールの単相溶液などの好適な変性剤の混合液に溶解した。この溶解物を塩化セシウムにおいて遠心分離によって、或いはクロロホルムで抽出した。イソプロパノール或いは酢酸ナトリウムのどちらかとエタノール、或いは別の方法でこの溶解物からRNAを沈殿させた。

#### 【0233】

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

#### 【0234】

ある場合には、Stratagene社にRNAを提供し、Stratagene社が対応するcDNAライブラリを作製した。そうでない場合は、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)またはSUPERScript プラスミドシステム(Life Technologies)を用いて当分野で周知の推奨方法または類似の方法でcDNAを合成してcDNAライブラリを作製した。(例えば、Ausubel, 1997, 前出, ユニット5.1-6.6を参照)。逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに結合させてから、好適な1つの制限酵素或いは複数の制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリでは、SEPHACRYL S 1000または SEPHAROSE CL2B、SEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、アガロースゲル電気泳動法によってcDNAの大きさ(300~1000bp)を選択した。PBLUEScriptプラスミド(Stratagene)またはpSPORT1プラスミド(Life Technologies)、pcDNA2.1プラスミド(Invitrogen Carlsbad CA)、PBK-CMVプラスミド(Str

atagene)、pINCYプラスミド(Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)、またはそれらの誘導体などの好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位にcDNAを結合させた。この組換えプラスミドを、Stratagene社のXL1-Blue, XL1-BlueMRF、SOLR、またはLife Technologies社のDH5 またはDH 10B、ELECTROMAX DH 10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に導入し組み込んだ。

#### 【0235】

##### 2 cDNAクローンの単離

上記実施例1に記載したように得たプラスミドを、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)或いは細胞溶解を利用したin vivo切除によって宿主細胞から回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、及びAGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid、QIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、REAL Prep 96プラスミドキットの内の少なくとも1つを用いてプラスミドを精製した。沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4℃で保管した。

#### 【0236】

別法では、ハイスループットの直接結合PCR法によって宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した。(Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程を単一反応混合液で行った。サンプルを処理してから384-ウェルプレートに移して保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)及びFluoroskan II蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光定量的に測定した。

#### 【0237】

##### 3 シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したインサイトcDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンシング反応は標準的な方法で行うか、またはHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific)或いはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体移送装置と共にABI CATALYST 800 (PE Biosystems) サーマルサイクラー或いはPTC-200 thermal cyler (MJ Research)などのハイ

スルーブット装置を用いて行った。cDNAのシーケンシング反応は、Amersham Pharmacia Biotech社の試薬、またはABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reactionキット(PE Biosystems)などのABIシーケンシングキットに含まれる試薬を用いて行った。cDNAシーケンシングの反応物の電気泳動的による分離及び標識したポリヌクレオチドの検出は、MEGABACE 1000 DNAシー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(PE Biosystems)、または当分野で周知のその他の配列解析システムを用いて行った。cDNA配列内の読み枠は、標準的な方法(Ausubel, 1997, 前出, unit 7.7)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例 8に記載した方法で配列を伸長した。

#### 【0238】

インサイトcDNAに由来する本ポリヌクレオチド配列の確認は、BLAST、動的プログラミング、およびジヌクレオチドの分布による解析(dinucleotide nearest neighbor analysis)に基づいたプログラム及びアルゴリズムを用いて、ベクター、リンカー、およびポリA配列を取り除き、更にあいまいな塩基対をマスクすることで行った。次に、インサイトcDNA配列およびそれらの翻訳を、公共のデータベースであるGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、および真核生物のデータベース、およびBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM、およびPFAMなどの隠れマルコフモデル(HMM)を基にしたタンパク質ファミリーのデータベースから選択した配列に対して問合せた(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス主構造を分析する確率的手法である。例えば、Eddy, S. R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 : 361-365を参照)。このような問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS、およびHMMRに基づいたプログラムを用いて行った。インサイトcDNA配列を組み立てて、完全長ポリヌクレオチド配列を作製した。或いは、GenBank cDNAs、GenBank EST、ステッチ配列(stitched sequence)、ストレッチ配列(stretched sequences)、またはGenscan-推定コード配列(実施例 4 および 5 を参照)を用いて、インサイトcDNA群を完全長の配列に伸長した。配列の組み立ては、Phred、Phehap、およびConsedに基づいたプログラムを用いて行い、GeneMark、BLAST、お

よびFASTAに基づいたプログラムを用いて、オープンリーディングフレームを決定するべくcDNA群をスクリーニングした。完全長のポリヌクレオチド配列を翻訳して対応する完全長ポリペプチド配列を得た。別法では、本発明のポリヌクレオチドは、完全長翻訳ポリヌクレオチドの任意のメチオニン残基から始まり得る。次に、完全長ポリペプチド配列をGenBankタンパク質データベース (genpept)、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM、Prosite、およびPFAMなどの隠れマルコフモデル (HMM) に基づいたタンパク質ファミリーデータベースに対して問合せ分析した。これらの完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) およびLASERGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いて分析した。ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列のアラインメントを、アラインメントした配列間のパーセント同一性も計算するMEGALIGNマルチシーケンスアラインメントプログラム (DNASTAR) に組み込まれたCLUSTALアルゴリズムによって指定されたデフォルトパラメータを用いて作成した。

#### 【0239】

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

#### 【0240】

完全長のポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の組み立て及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO:22 - 42のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20 ~ 約4000ヌクレオチドの断片を表4の列4に示した。

#### 【0241】

#### 4 ゲノムDNAからのコード配列の同定および編集

推定上のGタンパク質結合受容体は、公共のゲノム配列データベース（例えば、gbpriやgbhtg）においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Genscanは、様々な生物に由来するゲノムDNA配列を分析するための汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. および S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268 : 78-94、Burge, C. および S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8 : 346-354を参照）。このプログラムは推定エキソンを連結して、メチオニンから停止コドンまで伸長した組み立てcDNA配列を構築する。Genscanにより得られる配列は、FASTAデータベースのポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列になる。Genscanによって一回で解析できる配列の最大長さは30 kbに設定されている。これらのGenscan推定cDNA配列の内、どの配列がGタンパク質結合受容体をコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドをPFAMモデルにおいてGタンパク質結合受容体について問合せて分析した。潜在的なGタンパク質結合受容体が、Gタンパク質結合受容体としてアノテーションが付けられたインサイトcDNA配列に対する相同性を基に同定された。次に、これらの選択されたGenscan推定配列を、BLAST解析を用いてgeneptおよびgbpriデータベースの配列と比較した。必要に応じて、Genscan推定cDNA配列を、geneptにおいてBLASTで最もヒットした配列と比較して、Genscan推定配列における余分なエキソンや省いてしまったエキソンなどのエラーを修正し、編集した。BLAST解析を用いてGenscan推定cDNA配列を含むインサイトcDNAまたは公共のcDNAを見つけ出すことにより、転写の証拠が得られる。インサイトcDNAがGenscan推定cDNA配列を含む場合、この情報を用いてGenscan推定配列を修正或いは確認できる。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に説明した組み立て方法でGenscan推定コード配列とインサイトcDNAおよび/または公共のcDNA配列を組み立てて作製した。別法では、完全長ポリヌクレオチド配列は、その全てが編集した或いは未編集のGenscan推定コード配列から作製した。

【0242】

#### 5 cDNA配列データを用いるゲノム配列データの組み立て ステッチ配列 (Stiched Sequence)

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

#### 【0243】

##### ストレッチ配列(Stretched Sequence)

部分的なDNA配列をBLAST解析に基づいたアルゴリズムで完全長に伸長した。まず、実施例3に記載したように組み立てた部分的なcDNAを、BLASTプログラムを用いてGenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳類、脊椎動物、および真核生物のデータベースなどの公共のデータベースに対して問い合わせた。次に、GenBankの相同性の最も高いタンパク質を、実施例4に記載したインサイトcDNA或いはGenscanエキソン推定配列の何れかと比較した。得られた複数の高スコアのセグメント対(HSP)を用いてキメラタンパク質を作製し、GenBankの相同タンパク質上に翻

訳した配列をマッピングした。元のGenBankの相同タンパク質に対して、キメラタンパク質に挿入や欠失が起こり得る。公共のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を探し出すために、GenBankの相同タンパク質およびキメラタンパク質の両方をプローブとして用いた。このようにして、部分的なDNA配列を相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。完全な遺伝子を含んでいるか得られたストレッチ配列を検査した。

#### 【0244】

##### 6 GCRECをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO:22 - 42を組み立てるために用いた配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、インサイトLIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO:22 - 42と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap (表7)などの構築アルゴリズムを使用して、連続及び重複した配列のクラスターに組み入れた。Stanford Human Genome Center (SHGC)、Whitehead Institute for Genome Research (WIGR)及びGenethonなどの公共の情報源から入手できる放射線ハイブリッド (radiation hybrid) 及び遺伝子マッピングのデータを用いて、クラスター化した配列がすでにマッピングされているかを調べる。クラスターにマッピングされた配列が含まれている場合は、そのクラスターの全ての配列 (特定のSEQ ID NOを含む) をそのマッピング位置に割り当てた。

#### 【0245】

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

た区間が既に同定されている疾患遺伝子マップ内若しくは近傍に位置するかを決定できる。

#### 【0246】

#### 7 ポリヌクレオチド発現の分析

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

#### 【0247】

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

#### 【0248】

#### 【数1】

(BLAST スコア×配列一致率)

---

5 × (長さ(配列1), 長さ(配列2))の最小値

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

得られる。積スコア70は、100%の一致で一端が70%重畳しているか、或いは88%一致で他端が100%重畳しているかの何れかの場合である。積スコア50は、100%の一致で一端が50%重畳しているか、或いは79%の一致で他端が100%重畳しているかの何れかの場合である。

#### 【0249】

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

#### 【0250】

##### 8 GCRECをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列は、完全長分子の好適な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いてその完全長分子の好適な断片を伸長して作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'の伸長を開始するために合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'の伸長を開始するために合成した。開始プライマーは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは他の適切なプログラムを用いて、約22個から約30個のヌクレオチドの長さで約50%以上のGC含量を有し、かつ約68~72の温度で標的配列にアニールするよう

に設計した。ヘアピン構造及びプライマー - プライマー二量体が生じないようにヌクレオチドを伸長した。

#### 【0251】

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

#### 【0252】

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で増幅を行った。

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

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

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

ステップ7 4 で保管。

【0253】

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

【0254】

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

【0255】

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

- ステップ1 94 で3分間
- ステップ2 94 で15秒
- ステップ3 60 で1分間
- ステップ4 72 で2分間

ステップ5 ステップ2、3、及び4を29回繰り返す

ステップ6 72 で5分間

ステップ7 4 で保管。

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

#### 【0256】

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

#### 【0257】

##### 9 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識化及び使用法

SEQ ID NO:22 - 42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[<sup>32</sup>P]アデノシン三リン酸(Amersham, Chicago, IL)及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ(DuPont NEN, Boston MA)とを組み合わせて用いることにより標識する。標識されたオリゴヌクレオチドを、SEPHADEX G-25超精細排除デキストランビードカラム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて実質的に精製する。毎分10<sup>7</sup>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。

#### 【0258】

各切断物からのDNAを、0.7%アガロースゲル上で分画して、ナイロン製メンブラン (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に転写する。ハイブリダイゼーションは40℃で16時間かけて行う。非特異的シグナルを取り除くため、例えば、最大0.1Mクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムの条件の下、プロットを順次室温にて洗浄する。ハイブリダイゼーションパターンをオートラジオグラフィー或いは別のイメージ化手段で視覚化して比較する。

#### 【0259】

### 1.0 マイクロアレイ

マイクロアレイ上のアレイエレメントの連結または合成は、フォトリソグラフィ、ピエゾプリント (インクジェットプリンター、前出のBalteschweiler等を参照)、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものをを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一な非多孔性の固体とするべきである (Schena (1999).前出)。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。別法では、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱や紫外線、または化学的或いは機械的な結合手段で基板の表面にエレメントを配置して結合させることができる。通常のアレイは利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正な数のエレメントを含めることができる (Schena, M. 他 (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. 他 (1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. and J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31.を参照)。

#### 【0260】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片 (EST)、或いはそれらの断片やオリゴマーが、マイクロアレイのエレメントとなり得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片やオリゴマーを、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) などの当分野で周知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。このアレイエレメントを、生体サンプル中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる。生体サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識またはその他の分子タグに結合する。ハイブリダイゼーションの後、生体サンプルからハイブリダイズしな

かったヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントにおけるハイブリダイゼーションを検出する。別法では、レーザー脱離及び質量スペクトロメトリーを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上のエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの相補性の程度及び相対的存在量は、算定することができる。一実施例におけるマイクロアレイの調整及び使用について、以下に詳述する。

#### 【0261】

##### 組織または細胞サンプルの調製

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ(dT)セルロース法を用いてポリ(A)<sup>+</sup>RNAを精製する。各ポリ(A)<sup>+</sup>RNAサンプルは、MLLV逆転写酵素、0.05 pg/μlのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1×第1鎖緩衝液、0.03単位/μlのRNアーゼインヒビター、500 μM dATP、500 μM dGTP、500 μM dTTP、40 μM dCTP、40 μM dCTP-Cy3 (BDS)またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて逆転写する。この逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte)を用いて、200 ngのポリ(A)<sup>+</sup>RNAを含む25 ml容量で行う。特異的なコントロールポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、in vitro転写により非コーディング酵母ゲノムDNAから合成する。370 で2時間インキュベートした後、各反応サンプル(一方はCy3標識、他方はCy5標識)は、2.5 mlの0.5 M 水酸化ナトリウムで処理し、850 で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを変性する。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA)を用いて精製する。結合後、2つの反応サンプルを、1 mlのグリコーゲン(1 mg/ml)、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールを用いてエタノール沈殿させる。サンプルは次に、SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY)を用いて乾燥して仕上げ、14 μl 5×SSC/0.2% SDS中で再懸濁する。

#### 【0262】

##### マイクロアレイの準備

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを作製する。各アレイエレメントは、クローン化cDNA挿入断片を含むベクターを含有する細菌性細胞から増幅する。

PCR増幅は、cDNA挿入断片に隣接するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30サイクルのPCRによって、1~2 ngの初期量から5 µgを超える最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製する。

#### 【0263】

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

#### 【0264】

米国特許第5,807,522号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。この特許に引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が100 ng/µlのアレイエレメントDNA 1 µlを高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント (open capillary printing element) に充填する。次にこの装置が、スライド毎に約5 nlのアレイエレメントサンプルを分注する。

#### 【0265】

マイクロアレイには、STRATALINKER UVクロスリンカー (Stratagene) を用いてUV架橋する。マイクロアレイは、室温において0.2%SDSで1回洗浄し、蒸留水で3回洗浄する。非特異的な結合部位は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) における0.2%カゼイン中で60 °Cで30分間マイクロアレイをインキュベートし、その後上述したように0.2%SDS及び蒸留水で洗浄することによってブロックする。

#### 【0266】

##### ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、5 × SSC、0.2%SDSハイブリダイゼーシ

オン緩衝液にCy3及びCy5標識したcDNA合成産物を各0.2 µg含む9 µlのサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合液を、65 で5分間加熱し、マイクロアレイ表面上に一定量分注してから1.8 cm<sup>2</sup> のカバーガラスで覆う。このアレイを、顕微鏡スライドより僅かに大きいキャビティを有する防水チャンバーに移す。チャンバーの角に140 µlの5 × SSCを加えて、チャンバー内を湿度100%に保持する。このアレイを含むチャンバーを、60 で約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中(1 × SSC, 0.1% SDS)において45 で10分間、第2洗浄緩衝液中(0.1 × SSC)において45 で10分間それぞれ3回洗浄し、その後乾燥させる。

#### 【0267】

##### 検出

レポーター標識されたハイブリダイゼーション複合体は、Cy3を励起するための488 nm、及びCy5を励起するための632 nmのスペクトル線を生成し得るInnova 70混合ガス10 Wレーザー(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡で検出する。20倍の顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いて、アレイ上に励起レーザー光を集中させる。このアレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御X-Yステージに置き、対物レンズを通してラスタスキャンする。本実施例で用いた1.8 cm × 1.8 cmのアレイは、20 µmの解像度でスキャンする。

#### 【0268】

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

#### 【0269】

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

#### 【0270】

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

#### 【0271】

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

#### 【0272】

##### 1.1 相補的ポリヌクレオチド

GCRECをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的な配列は、天然のGCRECの発現を低下させるため即ち阻害するために用いられる。約15~約30個の塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、より小さな或いはより大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)及びGCREC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GCRECをコードする転写物に結合するのを阻害する。

### 【0273】

#### 1.2 GCRECの発現

GCRECの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でGCRECが発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定されるものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)などの好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル β-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとGCRECを発現する。真核細胞でのGCREC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、GCRECをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモーターによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda (Sf9)昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(例えば、Engelhard, E. K.他(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. 他(1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.を参照)。

### 【0274】

殆どの発現系では、GCREC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GCRECからタンパク質的に切断できる。アミノ酸8個のペプチドであるFLAGで、市販のモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いた免疫親和性の精製が可能となる。6個の連続するヒスチジン残基のストレッチである6-Hisによって、金属キレート樹脂(QIAGEN)で精製が可能となる。タンパク質の発現及び精製の方法は、Ausubel (1995, 前出, ch 10, 16)に記載されている。これらの方法で精製したGCRECを直接用いて以下の実施例の16、17、および18のアッセイを行うことができる。

#### 【0275】

##### 1.3 機能のアッセイ

GCREC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GCREC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。

#### 【0276】

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

#### 【0277】

##### 1.4 GCRECに特異的な抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE; 例えば、Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 1816 - 3088-495を参照)または他の精製技術で実質的に精製されたGCREC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。

#### 【0278】

別法では、GCRECアミノ酸配列をLASERGENEソフトウェア(DNASTAR)を用いて解析して免疫原性の高い領域を決定し、対応するオリゴペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を生産する。C末端付近の、或いは隣接する親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択については、当分野で

周知である(例えば、前出のAusubel, 1995, 11章を参照)。

#### 【0279】

通常、約15残基の長さのオリゴペプチドを、Applied BiosystemsのABI 431Aペプチドシンセサイザー(PE Biosystems)を用いてfmoc法のケミストリにより合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を用いた反応によりKLH(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫原性を高める(例えば、前出のAusubel, 1995を参照)。フロイントの完全アジュバントにおいてオリゴペプチド-KLH複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗GCREC活性を検査するには、ペプチドまたはGCRECを基板に結合し、1%BSAを用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

#### 【0280】

##### 1.5 特異的抗体を用いる天然GCRECの精製

天然GCREC或いは組換えGCRECを、GCREC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GCREC抗体とを共有結合させることにより形成する。結合の後、そのレジンを製造者の使用説明書に従ってブロッキング処理し洗浄する。

#### 【0281】

GCRECを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、GCREC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GCREC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、GCRECを回収する。

#### 【0282】

##### 1.6 GCRECと相互作用する分子の同定

GCRECと相互作用する分子には、アゴニスト、アンタゴニスト、およびGタンパク質などのシグナル伝達物質に関与する分子が含まれる。GCRECまたはその断片を、 $^{125}\text{I}$  Bolton-Hunter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。GCRECの断片には、例えば、3つの細胞外ループの内の1 或いは複数の細胞がいループ、細胞外のN末端領域、または第3の細胞外ループを含む断片が含まれる。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GCRECと共にインキュベートし、洗浄して、標識したGCREC複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なGCREC濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したGCRECの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

#### 【0283】

別法では、GCRECと相互作用する分子を、Fields, S.及びO. Song(1989, Nature 340:245-246)に記載の酵母2 - ハイブリッドシステム (yeast two-hybrid system) やMATCHMAKERシステム(Clontech)などの2 - ハイブリッドシステムに基づいた市販のキットを用いて分析する。GCRECはまた、ハイスループット型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス(CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、遺伝子の2つの大きなライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定することができる(Nandabalan, K. 他 (2000) 米国特許第6,057,101号)。

#### 【0284】

実施例17および18に示すアッセイを用いて、潜在的なGCRECのアゴニストまたはアンタゴニストを、GCREC受容体活性の活性化または阻害について検査することができる。候補となる分子は、既知のGPCRのアゴニストまたはアンタゴニスト、ペプチドライブラリ、または組み合わせキメラライブラリから選択され得る。

#### 【0285】

GCRECと、Gタンパク質などの細胞内シグナル伝達物質との相互作用を検出する方法は、オーファンGタンパク質結合7回膜貫通型受容体の内側セグメントすなわち細胞質ドメインが、既知のGタンパク質結合7回膜貫通型受容体の類似の

ドメインと置換するであろうという前提に基づいており、それを用いてそのオーファン受容体ドメインによって活性化されるGタンパク質および下流のシグナル伝達経路を同定する(Kobilka, B. K. ら (1988) Science 240 : 1310-1316)。同様に、オーファン受容体のドメインを、融合タンパク質の一部としてクローニングし、それを用いて特定のGタンパク質との相互作用を実証するための結合アッセイを行う。研究結果より、Gタンパク質結合7回膜貫通型受容体の第3の細胞内ループがGタンパク質の相互作用およびシグナル伝達に重要であることが分かった(Conklin, B. R. ら (1993) Cell 73 : 631-641)。例えば、GCRECの第3の細胞内ループに対応するDNA断片をPCR法で増幅して、pGEX (Pharmacia Biotech) などの融合ベクターにサブクローニングすることができる。この作製物を好適な細菌宿主に形質転換し、発現させ、その融合タンパク質を、グルタチオンセファロース4B (Pharmacia Biotech) アフィニティークロマトグラフィーを用いて細胞溶解物から精製する。

#### 【0286】

in vitro結合アッセイのために、Gタンパク質を含む細胞抽出物を、50 mM Tris、pH 7.8、1 mM EGTA、5 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM CHAPS、20% グリセロール、10 μgのアプロチニン、10 μgのロイペプチン、及び20 μl の50 mMフェニルメチルスルホニルフッ化物で抽出して準備する。この溶解物を、氷上で掻き混ぜながら45分間インキュベートし、23,000 × gで15分間4 で遠心分離し、上清を収集する。750 μgの細胞抽出物を、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質ビーズと共に4 で2時間インキュベートする。GSTビーズをリン酸緩衝生理食塩水で5回洗浄する。結合したGサブユニットを、百日咳毒素またはコレラ毒素での[<sup>32</sup>P]ADP-リボシル化によって検出する。SDSサンプルバッファー (4.6% (w/v) SDS、10% (v/v) β-メルカプトエタノール、20% (w/v) グリセロール、95.2 mM Tris-HCl、pH 6.8、0.01% (w/v) ブロムフェノールブルー) を追加して反応を停止させる。[<sup>32</sup>P]ADP標識したタンパク質を10% SDS-PAGEゲル上で分離させ、オートラジオグラフ法を実施する。これらの分離したタンパク質をニトロセルロース紙に移し、室温で1時間、blotto (5%脱脂粉末乳、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM CaCl<sub>2</sub>、80 mM NaCl、0.02% NaN<sub>3</sub>、および0.2% Nonidet

P-40)で遮断し、次にG サブタイプ選択抗体(1:500; Calbiochem-Novabiochem)で1.5時間インキュベートする。3回洗浄した後、プロットをカラシペルオキシダーゼ(HRP)接合ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン(1:2000, Cappel, Westchester PA)と共にインキュベートし、化学発光を利用したECL法(Amersham Corp.)によって視覚化する。

#### 【0287】

##### 1.7 GCRECの活性の実証

GCRECの活性についてのアッセイでは、細胞表面のGCRECの発現を測定する。GCRECをコードするcDNAを最適な哺乳動物細胞系に形質転換する。細胞表面タンパク質をビオチン標識する(e la Fuente, M. A. ら(1997) Blood 90: 2398-2405を参照)。GCREC特異的抗体を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降したサンプルをドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)および免疫プロットング技術を用いて分析する。標識した免疫沈降物と標識していない免疫沈降物との割合が、細胞表面で発現したGCRECの量に比例する。

#### 【0288】

別法では、GCRECの活性のアッセイは、リガンド/受容体仲介性の細胞増殖の変化を調べるプロトタイプアッセイに基づいている。このアッセイでは、Swissマウス3T3細胞におけるDNAの合成の速度を測定する。GCRECをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドを、当分野で周知のトランスフェクション法で静止状態の3T3培養細胞に加える。一過性にトランスフェクトされた細胞を、放射性DNA前駆体分子である $[^3\text{H}]$ チミジンの存在下でインキュベートする。次に、様々な量のGCRECリガンドを培養細胞に加える。ラジオアイソトープカウンタを用いて、酸沈降性DNAに組み込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの量を適当な時間の間測定する。組み込まれた量が新規に合成されたDNAの量に正比例する。少なくとも100倍のGCRECリガンドの濃度範囲に対して線形の線量効果曲線が、受容体の活性を表す。1 ml当たりの活性1単位を、50%の反応レベルが生じるGCRECの濃度と定義する。この場合、100%は、 $[^3\text{H}]$ チミジンが酸沈降性DNAに最大に組み込まれたことを表す(McKay, I. および I. Leigh, eds. (1993) Growth Factors: A Practical Approach, Oxford University Press, New York NY, p. 73)。

## 【0289】

更なる別法では、GCRECの活性のアッセイは、GPCRファミリータンパク質がGタンパク質仲介性セカンドメッセンジャーシグナル伝達経路を変える能力に基づいている(例えば、cAMP ; Gaudin, P. ら (1998) J. Biol. Chem. 273 : 4990-4996)。完全長GCRECをコードするプラスミドを、当分野で周知の方法を用いて哺乳動物細胞系に形質転換する(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞系(CHO)またはヒト胚腎細胞株(HEK-293))。形質転換細胞を12ウェルトレイの培養液で48時間増殖させ、次に培養液を捨て、付着している細胞をPBSで軽く洗浄する。次に、リガンドを含む培養液または含まない培養液で細胞を30分間インキュベートしてから培養液を捨て、1M過塩素酸で処理して細胞を溶解する。溶解産物中のcAMPのレベルを、当分野で周知の方法を用いてラジオイムノアッセイで測定する。リガンドに曝露しなかった細胞の溶解産物中におけるcAMPのレベルに対するリガンドに曝露した細胞の溶解産物中におけるcAMPのレベルの変化が、トランスフェクト細胞に存在するGCRECの量に比例する。

## 【0290】

イノシトールリン酸のレベルの変化を測定するために、1ウェル当たり $1 \times 10^5$ 細胞を含む24ウェルプレートで細胞を増殖させ、イノシトールを含まない培地および $[^3\text{H}]$ ミオイノシトール、 $2 \mu\text{Ci}$ /ウェルでインキュベートする。培地を除去してから、細胞を10 mM LiClを含むバッファーで洗浄し、次にリガンドを加える。この反応は、過塩素酸を加えて停止させる。イノシトールリン酸をDowex AG 1-X8 (Bio-Rad) 陰イオン交換樹脂上で抽出および分離し、標識したイノシトールリン酸の全てを液体シンチレーションでカウントする。リガンドに曝露しなかった細胞からの標識したイノシトールリン酸に対するリガンドに曝露した細胞からの標識したイノシトールリン酸のレベルの変化が、トランスフェクト細胞に存在するGCRECの量に比例する。

## 【0291】

1.8 GCRECリガンドの同定

CHO(チャイニーズハムスター卵巣)またはHEK293(ヒト胚腎)などの真核生物細胞系でGCRECを発現させる。これらの細胞系は、GPCRの発現に好適であり、

発現したGCRCと下流のエフェクターとの機能的な結合を可能にする種々のGタンパク質を含む。候補リガンドの存在下での発現された受容体の活性化を調べるために形質転換細胞をアッセイする。活性の測定は、サイクリックAMPやCa<sup>2+</sup>などの細胞内セカンドメッセンジャーの変化を調べて行う。測定には、当分野で周知の標準的な方法、或いはレポーター遺伝子アッセイを用いて行うことができる。このレポーター遺伝子アッセイでは、発光タンパク質（例えば、ホタルルシフェラーゼや緑色蛍光タンパク質）が、活性化された受容体によるプロテインキナーゼCの刺激に应答するプロモーターの転写制御下にある（Milligan, G. ら（1996）Trends Pharmacol. Sci. 17 : 235-237）。アッセイ技術は、これらのセカンドメッセンジャー系の両方に利用でき、FLIPR蛍光定量的プレート読出し装置（Molecular Devices）を用いた、アデニルシクラーゼ活性化FlashPlate アッセイ（NEN Life Sciences Products）またはFluo-4 AM（Molecular Probes）などの蛍光Ca<sup>2+</sup>インジケータなどのマルチウェルプレート型におけるハイスループット読出しを可能にする。生理学的に関連するセカンドメッセンジャー経路がわかっていない場合、ホスホリパーゼCおよびCa<sup>2+</sup>の動員に關与する経路をGCRCのシグナル伝達を通るように、広範なGタンパク質（Offermanns, S. および M. I. Simon（1995）J. Biol. Chem. 270 : 15175-15180）との結合が実証されたGタンパク質であるG<sub>15/16</sub>とGCRCを同時発現させることができる。或いは、GCRCを内在性GPCRが存在しない遺伝子組換え酵母系に発現させて、GCRC活性化スクリーニングにおける有利なバックグラウンドを提供することができる。これらの酵母系において、ヒトGPCRおよびGタンパク質を内在性酵母フェロモン受容体経路の対応する成分と置換する。また、下流のシグナル伝達経路を変更して、シグナルに対する正常な酵母の応答が、選択培地における正の成長或いはレポーター遺伝子の発現に変換されるようにする（Broach, J. R. および J. Thorne（1996）Nature 384（supp.）：14-16）。受容体を、既知のGPCRリガンドおよびその他の天然の生理活性分子を含む推定リガンドに対してスクリーニングする。

#### 【0292】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明の記載した方法

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

【0293】

(表の簡単な説明)

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

【0294】

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

【0295】

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

【0296】

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

【0297】

表5は、本発明のポリヌクレオチドの代表的なcDNAライブラリを示す。

【0298】

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

【0299】

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

【表1】

表1

インサイトプロジェクトID	ポリベブチド SEQ ID NO:	インサイト ポリベブチドID	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	インサイト ポリヌクレオチドID
7472033	1	7472033CDB1	22	7472033CDB1
7472034	2	7472034CDB1	23	7472034CDB1
7472035	3	7472035CDB1	24	7472035CDB1
7472036	4	7472036CDB1	25	7472036CDB1
7472037	5	7472037CDB1	26	7472037CDB1
7472039	6	7472039CDB1	27	7472039CDB1
7472040	7	7472040CDB1	28	7472040CDB1
4250893	8	4250893CDB1	29	4250893CDB1
6726656	9	6726656CDB1	30	6726656CDB1
7472062	10	7472062CDB1	31	7472062CDB1
7472067	11	7472067CDB1	32	7472067CDB1
7472072	12	7472072CDB1	33	7472072CDB1
7472074	13	7472074CDB1	34	7472074CDB1
7472077	14	7472077CDB1	35	7472077CDB1
7472082	15	7472082CDB1	36	7472082CDB1
7472128	16	7472128CDB1	37	7472128CDB1
7472134	17	7472134CDB1	38	7472134CDB1
7472136	18	7472136CDB1	39	7472136CDB1
7472142	19	7472142CDB1	40	7472142CDB1
7472171	20	7472171CDB1	41	7472171CDB1
7472172	21	7472172CDB1	42	7472172CDB1

【表2】

表2

ポリペプチド SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチドID	GenBank ID NO:	確率スコア	GenBank 相同体
1	7472033CD1	g4062997	4.3e-38	神経ペプチドY受容体4型 (Sus scrofa)
2	7472034CD1	g6532001	3.6e-89	匂い物質受容体S19 (マウス)
3	7472035CD1	g4680260	2.5e-72	匂い物質受容体S18 (マウス)
4	7472036CD1	g4680260	2.9e-87	匂い物質受容体S18 (マウス)
5	7472037CD1	g32093	2.5e-81	嗅覚受容体HGNP07J (ヒト)
6	7472039CD1	g3983374	9.3e-75	嗅覚受容体O6 (マウス)
7	7472040CD1	g7707801	1.0e-177	6タンパク質結合受容体O5L2 (ヒト)
8	4250893CD1	g3341996	5.0e-65	アンギオテンシン/バソプレシン受容体A11/AVP (ヒト) (Nao, M. 6 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(14):8175-8180)
9	6726556CD1	g3983408	7.4e-82	嗅覚受容体H7 (マウス) (Krautwurst, D. 6 (1998) Cell 95(7):917-926)
10	7472062CD1	g3746443	7.6e-80	嗅覚受容体 OR33Ch [Pan troglodytes] (Rouquier, S. 6 (1998) Hum. Mol. Genet. 7(9):1337-1345)
11	7472067CD1	g2358267	6.3e-23	ガラニン受容体 (マウス) (Jacoby, A. S. 6 (1997) Genomics 45(3):496-508)
12	7472072CD1	g1336043	3.4e-68	HsOLF3 (ヒト)
13	7472074CD1	g10732882	1.0e-47	嗅覚受容体I (ヒト)
14	7472077CD1	g8118040	1.0e-168	オプファン6タンパク質結合受容体 (ヒト)
15	7472082CD1	g2317704	2.2e-114	嗅覚受容体 (ドブネズミ) (McClintock, T. S. 6 (1997) Brain Res. Mol. Brain Res. 2:59-68)
16	7472128CD1	g1246534	3.5e-82	嗅覚受容体4 (ニワトリ) (Leibovici, M. 6 (1996) Dev. Biol. 175(1):118-131)
17	7472134CD1	g4680254	1.4e-78	匂い物質受容体S1 (マウス) (Malnic, B. 6 (1999) Cell 96(5):713-723)
18	7472136CD1	g206810	1.3e-43	6タンパク質結合受容体 (ドブネズミ) (Ross, P. C. 6 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3052-3056)
19	7472142CD1	g5869918	1.0e-93	嗅覚受容体 (マウス) (Strotmann, J. 6 (1999) Gene 236(2):281-291)
20	7472171CD1	g5869925	1.6e-134	嗅覚受容体 (マウス) (Strotmann, J. 6 (1999) Gene 236(2):281-291)
21	7472172CD1	g3983374	3.9e-76	嗅覚受容体O6 (マウス) (Krautwurst, D. 6 (1998) Cell 95(7):917-926)

【表3】

表3-1

SEQ ID NO:	インサイトポリペプチドID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
1	7472033CD1	470	S131, T153, S24, S73, Y82	N2, N46, N51, N56	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン 6タンパク質結合受容体モチーフ: V184-I200 膜貫通ドメイン: P80-Y105, L145-Y164, V214-Y234, Y271-Y291 7回膜貫通受容体(ロドプシンファミリー)シグネチャ: L140-Y379 6タンパク質結合受容体シグネチャ: Y164-P203, Y280-Y291, R316-P342, S371-R387 6タンパク質結合受容体シグネチャ: A175-A224 神経ペプチドY受容体シグネチャ: T153-G165, Q178-A193, R314-I326, M366-N375, L377-I390 ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: M84-S108, Q178-I200, G212-V233, F269-A290, S272-Y295, T321-Y345, Y361-R387 推定上の6タンパク質結合受容体シグネチャ: I174-A191, G380-L393 T220, 12タンパク質(6タンパク質結合受容体に類似): PD061410, Y271-A415 6タンパク質結合受容体: PD000009, L140-Y234	MOTIFS HMMER HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS PROFILESSCAN BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM

【表4】

表3-2

SEQ ID NO:	インサイト 米リベチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、 及びドメイン	分析方法及び データベース
1					6タンパク質結合受容体 DM00013   P49683   54-350: L140-L394 DM00013   P50391   35-337: S141-L394 DM00013   P49146   44-341: M84-K388 DM00013   P25929   34-335: S141-Q391	BLAST-DOMO
2	7472034CD1	326	T276 T323 S123 T323	N57	6タンパク質結合受容体モチーフ: M125-I141 膜貫通ドメイン: W61-D67, M161-C184, T208-G230 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) シグネチャ: G56-Y307 6タンパク質結合受容体シグネチャ: H105-P144, E247-S273, F366-H277, P299-R315 嗅覚受容体シグネチャ: M74-K95, A192-E206, F253-V268 ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: W41-F62, W41-W65, M74-K95, I119-I141, G214-L237, A252-T276, V289-R315 嗅覚受容体 PD000921: L181-I260 推定上の6タンパク質結合受容体RA1c PD170483: I260-F322	MOTIFS  HMNER HMNER-PFAM  BLIMPS- BLOCKS  BLIMPS- PRINTS BLIMPS- PRINTS  BLAST- PRODOM BLAST- PRODOM
					6タンパク質結合受容体: DM00013   P23269   15-304: I32-V321 DM00013   P30955   18-305: L49-V321 DM00013   S29708   18-306: Q39-V321 DM00013   P23274   18-306: E37-V321	BLAST-DOMO

【表5】

表3-3

SEQ ID NO:	インサイト ホリベラチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、 及びドメイン	分析方法及び データベース
3	7472035CD1	315	T49 T103 S172 S48 T144 S224		シグナルペプチド: M1-A28 シグナルペプチド: M1-A28 膜貫通ドメイン: Y30-S48 7回膜貫通受容体 (ロドプシニアファミリー) シグネチャ: G36-Y288 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: S85-P124, T227-S253, P280-R296 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: P97-R146	MOTIFS HMMER HMMER HMMER-PFAM BLIMPS- BLOCKS PROFILES SCAN
4	7472036CD1	314	S110	N5 N44	嗅覚受容体シグネチャ: M54-K75, S172-D186, L233-L248 アンギオテンシンII受容体シグネチャ: I209-V220 EDG1 オープラン受容体シグネチャ: A43-F57 嗅覚受容体P000821: L161-V240 Gタンパク質結合受容体: DM00013   P23274   18-306: I12-I299 DM00013   G4574   18-309: P13-E297 DM00013   S29708   18-306: H19-I299 DM00013   P23269   15-304: Q16-I299 Gタンパク質結合受容体モチーフ: M112-I128 膜貫通ドメイン: I27-L42, I199-L218 7回膜貫通受容体 (ロドプシニアファミリー) シグネチャ: G43-Y294	MOTIFS HMMER HMMER-PFAM

【表6】

表3-4

SEQ ID NO:	インサイトポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
4					<p>Gタンパク質結合受容体シグネチャ: R92-P131, E234-S260, P286-R302</p> <p>Gタンパク質結合受容体シグネチャ: F104-R152</p> <p>嗅覚受容体シグネチャ: M61-K82, C179-D193, F240-T255, L278-V289</p> <p>メラノコルチン受容体シグネチャ: A53-L65</p> <p>ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: W28-Q52, M61-K82, L106-I128, I143-L164, G201-L224, A203-V227, I276-R302</p> <p>嗅覚受容体 PD000921: Y170-I247</p> <p>推定上のGタンパク質結合受容体 RA1c PD170483: I247-F309</p> <p>Gタンパク質結合受容体: DM00013   P23275   17-306: H24-I305 DM00013   G45774   18-309: P20-I305 DM00013   S29708   18-306: E23-V308 DM00013   P23269   15-304: E23-V308</p> <p>膜貫通ドメイン: P33-G49, Y148-I171, L205-I229</p> <p>7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) シグネチャ: G49-Y298</p>	<p>BLIMPS- BLOCKS</p> <p>PROFILESSCAN</p> <p>BLIMPS- PRINTS</p> <p>BLIMPS- PRINTS</p> <p>BLIMPS- PRINTS</p> <p>BLAST- PRODOM</p> <p>BLAST- PRODOM</p> <p>BLAST- DOMO</p> <p>HMMER</p> <p>HMMER-PFAM</p>
5	7472037CD1	321	S75 S196 S201 S240 T299	N12 N50		

【表7】

表3-5

SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
5					6タンパク質結合受容体シグネチャ: Q98-F137, F208-F219, R243-R269, T290-R306  6タンパク質結合受容体シグネチャ: F110-S159  嗅覚受容体シグネチャ: M67-N88, F185-E199, F246-G261, V282-L293, F299-L313 メラノコルチン受容体シグネチャ: V59-L71, I134-R145 嗅覚受容体 PD000921: F176-L253 嗅覚受容体 PD149621: T254-R315 6タンパク質結合受容体: DM00013 P30954 29-316; S26-L309 DM00013 P23270 18-311; L31-L313 DM00013 P30955 18-305; P29-K311 DM00013 S29709 11-299; P29-L313  6タンパク質結合受容体モチーフ: S112-I128 シグナルペプチド: M1-A53 膜貫通ドメイン: M61-L84, A98-M120, S207-L229, F241-V263 7回膜貫通受容体(ロドプシン)シグネチャ: G43-Y293  6タンパク質結合受容体シグネチャ: H92-P131, Q238-R264, T285-K301	BLIMPS- BLOCKS  PROFILESKAN  BLIMPS- PRINTS  BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM BLAST- PRODOM BLAST-DOMO  MOTIFS  SPSCAN HMMER  HMMER-PPM  BLIMPS- BLOCKS
6	7472039CD1	331	S69 S24 T195 S235 S326	N6 N40 N67		

【表8】

表3-6

SEQ ID NO.	インサイトド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
6					6タンパク質結合受容体シグネチャ: Y104-A149  嗅覚受容体シグネチャ: M61-K82, F180-N194, F241-G256, V277-L288, A294-F308 メラノコルチン受容体シグネチャ: A53-L65, I128-S139 嗅覚受容体 PD000921: L168-I249 嗅覚受容体 PD149621: V250-K310 6タンパク質結合受容体: DM00013   P23267   20-309: P20-K305 DM00013   P23270   18-311: R26-K305 DM00013   P23274   18-306: F30-L304 DM00013   P30955   18-305: F30-K305	PROFILES SCAN  BLIMPS- PRINTS  BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM BLAST- PRODOM BLAST-DOMO
7	7472040CD1	337	S17 S323 S326 S194 T327 S333	N3	7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) シグネチャ: G52-D131, V153-F291  6タンパク質結合受容体シグネチャ: W100-F139, F209-H220, W226-L252, H283-L299  G5A アナフィラトキシン受容体シグネチャ: V59-W72, C83-P93, L110-S121 P111-L123  ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: A37-G61, G69-L90, I114-A136, G150-I171, T201-L224, C231-V255, E273-L299	HMMER-FFAM  BLIMPS- BLOCKS  BLIMPS- PRINTS  BLIMPS- PRINTS

【表9】

表3-7

SEQ ID NO:	インサイトポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
7					プロスタノイドEP1受容体シグネチャ: W58-L73 Gタンパク質結合受容体: PD000009: W72-Y172 Gタンパク質結合受容体: DM00013   P30992   32-317: L39-L292 DM00013   P21730   31-315: V36-L303 DM00013   P30993   27-313: P33-P304 DM00013   A46525   31-317: P33-P304	BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM ELAST-DOMO
8	4250893CD1	1473	S990 S37 S49 S99 S162 S258 S299 S368 S379 S400 S485 S509 S587 T747 T850 T866 T868 S923 T962 T993 S1047 S1064 T1075 S1313 S1371 T1394 S132 S144 S227 T457 S484 T543 T670 T831 T841 S893 S985 S1009 S1017 S1107 S1258 S1464 Y1311 Y1445	N727 N864 N1005	膜貫通ドメイン: G1216-L1237 ロインリンチリビート: N809-R833; L838-R862; T866-R890; K895-P922; S923-R947 受容体アンキオチンシン/バソプレシン AII/AVP バソプレシン PD156095: M534-V704 ATP/GTP 結合部位 (P-loop): G334-S341	HMMER HMMER-PFAM ELAST-PRODOM MOTIFS
9	6726656CD1	328	S17 T309	N23	膜貫通ドメイン: V43-I63; Y211-M231 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G59-Y308 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: S108-P147; S300-K316	HMMER HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS

【表10】

表3-8

SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 特殊数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	解析方法及びデータベース
9					6タンパク質結合受容体シグネチャ: Y120-V166  嗅覚受容体シグネチャ: M77-K98; F195-S209; F256-T271; A292-L303; T309-F323  受容体配列タンパク質 結合6タンパク質結合 受容体結合タンパク質 多量運送タンパク質ファミリー PD000921; L184-L263  6タンパク質結合受容体: DM00013   E23266   I7-306; S36-L322  6タンパク質結合受容体モチーフ: S128-I144  嗅覚受容体ドメイン: F96-L116; V268-I291; G310-I328  7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G109-Y358  6タンパク質結合受容体シグネチャ: K158-P197; I350-K366  6タンパク質結合受容体シグネチャ: F170-G215  嗅覚受容体シグネチャ: M127-K148; F245-E259; L306-I321; A342-L353; T359-V373	PROFILESCAN  BLIMPS- PRINTS  BLAST- PRODOM  BLAST-DOMO  MOTIFS  HMMER  HMMER-PFAM  BLIMPS- BLOCKS  PROFILESCAN  BLIMPS- PRINTS
10	7472062CD1	384	T298 S34 S36 T69 T256 S10 T146 T205 T231 S258 T338 T359 Y378	N49 N73 N133 N223		

【表11】

表3-9

SEQ ID NO:	インサートポリペプチドID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
10					膜タンパク質結合受容体 DM00013 S51356 18-307; L85-A368 6タンパク質結合受容体モチーフ: V178-V194 膜貫通ドメイン: A41-L61 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G53-A133; W155-F306	BLAST- PRODOM  BLAST-DOMO  MOTIFS  HMMER  HMMER-PFAM
11	7472067CD1	419	T234 S81 S102 T331 S358 S398 T177 T326 S370 T375	N10 N15 N79 N151	膜タンパク質結合受容体 DM00013 P47211 27-319; V49-K322 膜貫通ドメイン: L30-F47; I101-M118; M197-I214 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G41-Y290 6タンパク質結合受容体シグネチャ: G90-P129; L207-Y218; T282-W298	BLIMPS- BLOCKS  BLIMPS- PRINTS  BLAST-DOMO  HMMER  HMMER-PFAM  BLIMPS- BLOCKS
12	7472072CD1	314	S67 S188 S227 S291	N5 N155	ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: I38-L62; I73-I94; T153-F174; V248-W272; I288-R314	BLIMPS- PRINTS  BLAST-DOMO  HMMER  HMMER-PFAM  BLIMPS- BLOCKS

【表12】

表3-10

SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
12					シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン Gタンパク質結合受容体シグネチャ: F102-S147 ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: L26-R50; M59-K80; L104-V126; L199-L222; A237-V261; N272-W298 嗅覚受容体シグネチャ: M59-K80; F177-D191; V238-G253; V274-L285; S291-L305 受容体嗅覚タンパク質 受容体シグネチャ Gタンパク質結合 膜貫通タンパク質 多重膜タンパク質 Y168-I245	PROFILES SCAN BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM
13	7472074CD1	254	T159 S185 S110 S111 T150 T178 S222	N154 N157	Gタンパク質結合受容体: DM0013   F23275   17-306; L26-L305 Gタンパク質結合受容体モチーフ: A110-V126 シグナルペプチド: M1-G61 膜貫通ドメイン: V127-F145; M182-S199; I235-V254 5-ヒドロキシトリプトタミンA受容体シグネチャ: H48-A68 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: Y73-R112; S226-F252 フェロモン受容体 VN1 VN2 VN3 VN7 VN5 VN4 VN6 PD009900: R38-Y246	BLAST-DOMO MOTIFS SPSCAN MOTIFS BLIMPS-PRINTS BLIMPS-BLOCKS BLAST-PRODOM

【表13】

表3-11

SFO ID NO:	インサイト 米リベプテド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列、モチーフ、 及びドメイン	分析方法及び データベース
14	7472077CD1	362	S8 S268		膜貫通ドメイン: S28-M48; F66-N85; V91-A109; C164-M181; L205-L224; W251-N278 7回膜貫通受容体 (代謝調節型グルタミン酸ファミリー) ドメイン: W22-Q271 (スコア: -137.1; E値: 0.35) B1ラジキニン受容体シグネチャ: T37-Q56 PROTEIN BRIDE OF SEVENTEENLESS PRECURSOR TRANSMEMBRANE GLYCOPROTEIN VISION SIGNAL PD151485: V91-E260 膜貫通ドメイン: F88-L108; R203-L228; L260-A283 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G101-Y350 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: N150-P189; V342-K358 嗅覚受容体シグネチャ: M119-K140; Y237-S251; F298-G313; S334-L345; S351-L365 受容体嗅覚タンパク質 受容体結合Gタンパク質結合 膜貫通糖タンパク質 多重運送子ファミリー PD000921: L226-L306 Gタンパク質結合受容体: DM0013 S51356 18-307; L77-V361	HMMER  HMMER-PFAM  BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM  BLIMPS- BLOCKS  BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM  BLAST- DOMO
15	7472082CD1	370	S334 S42 S68 S127 S153 S326 T138 T147 S351	N65		

【表14】

表3-12

SEQ ID NO.	インサイトポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
16	7472128CD1	319	T2 S74 T85 S95 T201 S298	N274	膜貫通ドメイン: V204-G226 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G48-Y297 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: K97-P136; I214-Y225; I289-K305 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: F110-A157	HMMER HMMER-PFAM  BLIMPS-BLOCKS PROFILESCAN
17	7472134CD1	312	S67 S87 S204 S291	N5	嗅覚受容体シグネチャ: M66-K87; Y184-N198 L245-G260; V281-L292; 5298-L312 受容体結合タンパク質 受容体結合タンパク質 膜貫通糖タンパク質 多重遺伝子ファミリー P0000921: L173-L253 Gタンパク質結合受容体: DM00013   S51356   18-307: P28-R310 Gタンパク質結合受容体モチーフ: A117-I133 シグナルペプチド: M1-G41 膜貫通ドメイン: L29-V48; I207-L226; I238-L262 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G41-Y290 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: K90-P129; I282-K298	BLAST-DOMO  MOTIFS SPSCAN HMMER HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS

【表15】

表3-13

SEQ ID NO.	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
17					Gタンパク質結合受容体シグネチャ: Y102-I146 ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: Y26-G50; M59-K80; F104-I126; D199-I222; Q272-K298 嗅覚受容体シグネチャ: M59-K80; V177-D191; I238-G253; L274-L285; S291-L305 受容体嗅覚タンパク質受容体様Gタンパク質結合膜貫通タンパク質多量糖鎖タンパクファミリー P0000921: L166-H244 Gタンパク質結合受容体: DM00013   P23267   20-309; F17-K306 Gタンパク質結合受容体モチーフ: I110-I126 膜貫通ドメイン: Y109-F129; V229-Y245 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G44-S78; L104-Y276 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: V91-P130; R214-Y240; S268-S284 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: L104-L149	PROFILESAN BLIMPS-PRINTS BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-DOMO MOTIFS HAMMER HAMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS PROFILESAN
18	7472136CD1	321	S209 T94 T121 S281 S284	N2 N6 N16 N92		

【表16】

表3-14

SEQ ID NO:	インサイトポリペプチドID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
18					<p>ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: V29-653; F61-182; M108-V127; L219-V243; F258-S284</p> <p>推定上のGタンパク質結合受容体 薬理通縮タンパク質Gタンパク質結合 プロトオオコンジーンGタンパク質結合 PD013244; C176-E305</p> <p>Gタンパク質結合受容体: DM00013   P23749   38-307; V29-L287</p> <p>膜貫通ドメイン: F28-148; Y102-D121; L199-1227</p> <p>7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: 641-Y289</p> <p>Gタンパク質結合受容体シグネチャ: K90-P129; I281-K297</p> <p>Gタンパク質結合受容体シグネチャ: Y102-V147</p> <p>糖物質 (オプシン) レチナール結合部位: S262-H315</p> <p>ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: V26-150; M59-T80; S104-I126; M198-L221; A236-K260; K271-K297</p> <p>嗅覚受容体シグネチャ: M59-T80; F176-S190; F237-G252; I273-L284; S290-L304</p>	BLIMPS-PRINTS  BLAST-PRODOM  BLAST-DOMO  HMNER  HMNER-PFAM  BLIMPS-BLOCKS  PROFILESCAN  PROFILESCAN  BLIMPS-PRINTS  BLIMPS-PRINTS
19	7472142CD1	316	T49 S67 T228 S88 S290	N5 N42 N65		

【表17】

表3-15

SEQ ID NO:	インサイトポリペプチドID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ(signature)配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
19					受容体噴霧タンパク質 受容体様Gタンパク質結合 膜貫通輸タンパク質 多重運送子ファミリー PD000921 ; L166-L244	BLAST- PRODOM
20	747217LCD1	325	S49 S67 T118 S156 S193 S87 S88 S137 S163 T178 S291	N5 N65 N191	Gタンパク質結合受容体: DM00013   P23275   17-306; S18-G305 Gタンパク質結合受容体モチーフ: T110-I126 膜貫通ドメイン: L143-S163; S203-V228 7回膜貫通受容体(ロドプシンファミリー) ドメイン: G41-Y290 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: K90-P129; T282-K298 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: L103-A147 噴霧受容体シグネチャ: V59-L80; F177-N191; F238-G253; F274-L285; S291-N305 受容体噴霧タンパク質 受容体様Gタンパク質結合 膜貫通輸タンパク質 多重運送子ファミリー PD000921 ; L166-L245 Gタンパク質結合受容体: DM00013   A57089   15-304; F17-G306 Gタンパク質結合受容体モチーフ: T110-I126	BLAST-DOMO  MOTIFS  HMMER  HMMER-PFAM  BLIMPS- BLOCKS  PROFILES CAN  BLIMPS- PRINTS  BLAST- PRODOM  BLAST-DOMO  MOTIFS

【表18】

表3-16

SEQ ID NO:	インサイト ポリペプチド ID	アミノ酸 残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的 グリコシル化部位	シグネチャ (signature) 配列、モチーフ、及びドメイン	分析方法及びデータベース
21	7472172CD1	313	T6 S65 S263 T76 S288	N3 N40 N63 N262	シグナルペプチド: M1-T36 膜貫通ドメイン: I10-T32; M96-M116; L191-L208 7回膜貫通受容体 (ロドプシンファミリー) ドメイン: G39-Y287 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: K88-P127; T279-Q295 Gタンパク質結合受容体シグネチャ: Y100-L144 ロドプシン様GPCRスーパーファミリーシグネチャ: S24-W48; M57-K78; Y102-I124; A138-I159; N196-I219; K269-Q295 嗅覚受容体シグネチャ: M57-K78; F174-N188; F235-Q250; A271-L282; S288-V302 受容体膜タンパク質 受容体膜タンパク質結合 膜貫通タンパク質 多重膜タンパク質ファミリー PD0000921: L164-I242 Gタンパク質結合受容体: DM00013   P23267   20-309; F15-V302 Gタンパク質結合受容体モチーフ: V108-I124	SPSCAN HMMER HMMER-PFAM BLOCKS- BLIMPS PROFILESCAN BLIMPS- PRINTS BLIMPS- PRINTS BLAST- PRODOM BLAST-DOMO MOTIFS

【表19】

表4-1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	インサイト ポリヌクレオチドID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
22	7472033CB1	1413	1-1413	GNN.95902227_030.edic	1	1413
23	7472034CB1	1076	212-1076	GNN.96087993_008.edic	1	1076
24	7472035CB1	948	1-87, 908-948, 377-798	GNN.96088009_006	1	948
25	7472036CB1	945	1-36	GNN.96088009_016	1	945
26	7472037CB1	966	1-46, 931-966	GNN.96094563_010	1	966
27	7472039CB1	996	1-94, 585-996, 454-524	GNN.96094604_016	1	996
28	7472040CB1	1014	1-843	GNN.96165152_010	1	1014
29	4250693CB1	5122	3275-3357, 1-1445, 4869-5122, 2954-3232, 4873-4944, 4411-4479, 1740-2862, 3840-4064	SBSA02572V1 5080262H1 (LNODNOT11) 4882636F6 (LUNLMT01) 639691X12F1 (BRSTNOT03) 2654889F6 (THYNOT04) 94589483_CD 2831336F6 (TLYNOT03) SAFB00488F1 1559811H1 (SPLNOT04) 3345781H1 (SPLNOT09) 4220888H1 (PANCNOT07) 5090301F6 (UTRSTMR01) 504356R6 (TWLR3DT02) SBSA00168V1 SAFC01343F1 4882636T6 (LUNLMT01)	4180 2345 508 2904 2372 339 1 3464 3448 1626 3883 1659 4586 4155 3022 621	4818 2606 909 3418 2912 4294 513 4111 3642 1884 4171 2322 5122 4681 3565 1150

【表20】

表4-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	インサイト ポリヌクレオチドID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
30	6726656CB1	1241	1-311	GNN.g6524208_008	312	1241
31	7472062CB1	1155	1-211, 649-921, 1104-1155	6726656H1 (COLITUT02) GNN.g6009916_000010_002	1	580 1155
32	7472067CB1	1260	1-1260	GNN.g6013566_000014_004	1	1260
33	7472072CB1	945	920-945	GNN.g6165017_000177_002	1	945
34	7472074CB1	765	538-765	GNN.g6165038_000059_002	1	765
35	7472077CB1	1089	897-944	GNN.g5815499_006	1	1089
36	7472082CB1	1334	1-181	GNN.g6521401_012 g5754986	1 883	1113 1334
37	7472128CB1	960	1-22, 477-642, 940-960	GNN.g6451812_008.edit	1	960
38	7472134CB1	939	1-223, 756-804, 887-927	GNN.g6479069_014	1	939
39	7472136CB1	968	1-968	GNN.g6498052_008.edit	1	968
40	7472142CB1	1000	1-82, 975-1000, 563-684	GNN.g6524207_010.edit	1	1000
41	7472171CB1	1008	1-33, 931-1008	GNN.g6562243_020.edit	1	1008
42	7472172CB1	972	1-29, 605-972	GNN.g6525268_002.edit	1	972

【表21】

表5

ポリヌクレオチド SEQ_ID_NO.	インサイトプロジェクトID	代表的ライブラリ
29	4250893CB1	SYNORAT05
30	6726656CB1	COLIFUT02

【表22】

表6

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
COLITUT02	pINCY	このライブラリは、29歳の女性から採取した回盲弁の結腸癌組織から単離したRNAを用いて作製した。病理学的には、腸重複および閉塞に関連して回盲弁領域にポリープ状の腫瘤の形成を伴った、悪性リンパ腫、小細胞、非切断（パーキットリンパ腫、B細胞表現型）であった。肝臓および12の3の回盲部リンパ節のリンパ腫が及んでいた。
SYNORAT05	PSPORT1	このライブラリは、リウマチ様関節炎の62歳の白人女性の膝滑膜組織から単離したRNAを用いて作製した。

【表23】

表7-1

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して不定の塩基をマスクするプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	Fast Data Finder は、アミノ酸または核酸配列の比較及び注釈付け (annotation) に有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列を構築するプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool は、アミノ酸及び核酸配列の配列類似性検索に有用であり、blastp 及び blastn、blastx、tblastn、tblastx の5つのファンクションがある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値=1.0E-10 以下
FASTA	Pearson 及び Lipman アルゴリズムは、問合わせの配列と同種の配列群との類似性を検索する。FASTA は、fasta 及び tfasta、fastx、tfastx、ssearch の少なくとも5つのファンクションを含む。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183: 63-98; Smith, T.F. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E 値=1.06E-6 構築された ESTs: fasta 同一性=95%以上、一致長さ=200 塩基以上、fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列: fastx スコア=100 以上
BLIMPS	BLOCKS IMPROVED Searcher は、BLOCKS 及び PRINTS、DOMO、PRODOM、PFAM データベースにおける配列に対して、ある配列の一致性を調べ、遺伝子ファミリー及び配列相同性、構造的ファンクション領域を探索する。	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.	確率値=1.0E-3 以下
HMMER	PFAM などのタンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベースに対して問合せ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol., 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1998) Nucleic Acids Res. 26:320-322. Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM ヒット: 確率値=1.0E-3 以下 シグナルペプチドヒット: スコア=0 以上

【表24】

表7-2

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター関連
ProfileScan	Prosite で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列における構造及び配列のモチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	標準化された質のスコアを特定 の Prosite モチーフに対する GCG 指定 "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誤出しアルゴリズムである。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づく SWAT や CrossMatch を含む Phrap Revised Assembly プログラムであって、配列相同性の検索及び DNA 配列の構築に有用である。	Smith, T.F. and M. S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120 以上 一致長さ=56 以上
Consed	Phrap で構築したものの表示及び編集をするためのグラフィックツールである。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキヤンして分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み付けマトリクス解析プログラムである。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10: 1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12: 431-439.	スコア=3.5 以上
TMAP	重み付けマトリクスを用いたタンパク質配列上の膜貫通セグメントの明確化および向きを決定するためのプログラム	Persson, B. and P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMM	隠れマルコフモデル (HMM) を用いたタンパク質配列上の膜貫通セグメントの明確化および向きを決定するためのプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., Glasgow 他 eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	Prosite で定義された配列と一致したパターンについてアミノ酸配列を検索するプログラムである。	Bairoch 他、(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

## 【配列表】

<110> INCYTE GENOMICS, INC.  
 BAUGHN, Mariah R.  
 AU-YOUNG, Janice  
 YUE, Henry

<120> G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS

<130> PI-0032 PCT

<140> To Be Assigned  
 <141> Herewith

<150> 60/180,093; 60/182,045  
 <151> 2000-02-02; 2000-02-11

<160> 42  
 <170> PERL Program

<210> 1  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 7472033CD1

<220>  
 <221> unsure  
 <222> 59, 128, 309  
 <223> unknown or other

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

```

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

```

```

<210> 2
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472034CD1

```

```

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

```

```

185                               190                               195
His Met Ala Val Val Lys Leu Ala Cys Ser Glu Thr Thr Val Asn
200                               205                               210
Arg Ala Tyr Gly Leu Thr Met Ala Leu Leu Val Ile Gly Leu Asp
215                               220                               225
Val Leu Ala Ile Gly Val Ser Tyr Ala His Ile Leu Gln Ala Val
230                               235                               240
Leu Lys Val Pro Gly Ser Glu Ala Arg Leu Lys Ala Phe Ser Thr
245                               250                               255
Cys Gly Ser His Ile Cys Val Ile Leu Val Phe Tyr Val Pro Gly
260                               265                               270
Ile Phe Ser Phe Leu Thr His Arg Phe Gly His His Val Pro His
275                               280                               285
His Val His Val Leu Leu Ala Thr Arg Tyr Leu Leu Met Pro Pro
290                               295                               300
Ala Leu Asn Pro Leu Val Tyr Gly Val Lys Thr Gln Gln Ile Arg
305                               310                               315
Gln Arg Val Leu Arg Val Phe Thr Gln Lys Asp
320                               325

```

<210> 3

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Incyte ID No: 7472035CD1

<400> 3

```

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

```

```

                275 .                280                285
Ile Ile Tyr Gly Met Arg Thr Lys Gln Leu Arg Glu Arg Ile Trp
                290                295                300
Ser Tyr Leu Met His Val Leu Phe Asp His Ser Asn Leu Gly Ser
                305                310                315

```

```

<210> 4
<211> 314
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472036CD1

```

```

<400> 4
Met Ser Ala Ser Asn Ile Thr Leu Thr His Pro Thr Ala Phe Leu
 1      5      10      15
Leu Val Gly Ile Pro Gly Leu Glu His Leu His Ile Trp Ile Ser
 20     25     30
Ile Pro Phe Cys Leu Ala Tyr Thr Leu Ala Leu Leu Gly Asn Cys
 35     40     45
Thr Leu Leu Leu Ile Ile Gln Ala Asp Ala Leu His Glu Pro
 50     55     60
Met Tyr Leu Phe Leu Ala Met Leu Ala Ala Ile Asp Leu Val Leu
 65     70     75
Ser Ser Ser Ala Leu Pro Lys Met Leu Ala Ile Phe Trp Phe Arg
 80     85     90
Asp Arg Glu Ile Asn Phe Phe Ala Cys Leu Ala Gln Met Phe Phe
 95    100    105
Leu His Ser Phe Ser Ile Met Glu Ser Ala Val Leu Leu Ala Met
110    115    120
Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Lys Pro Leu His Tyr Thr
125    130    135
Lys Val Leu Thr Gly Ser Leu Ile Thr Lys Ile Gly Met Ala Ala
140    145    150
Val Ala Arg Ala Val Thr Leu Met Thr Pro Leu Pro Phe Leu Leu
155    160    165
Arg Cys Phe His Tyr Cys Arg Gly Pro Val Ile Ala His Cys Tyr
170    175    180
Cys Glu His Met Ala Val Val Arg Leu Ala Cys Gly Asp Thr Ser
185    190    195
Phe Asn Asn Ile Tyr Gly Ile Ala Val Ala Met Phe Ile Val Val
200    205    210
Leu Asp Leu Leu Leu Val Ile Leu Ser Tyr Ile Phe Ile Leu Gln
215    220    225
Ala Val Leu Leu Leu Ala Ser Gln Glu Ala Arg Tyr Lys Ala Phe
230    235    240
Gly Thr Cys Val Ser His Ile Gly Ala Ile Leu Ala Phe Tyr Thr
245    250    255
Thr Val Val Ile Ser Ser Val Met His Arg Val Ala Arg His Ala
260    265    270
Ala Pro His Val His Ile Leu Leu Ala Asn Phe Tyr Leu Leu Phe
275    280    285
Pro Pro Met Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Val Lys Thr Lys Gln
290    295    300
Ile Arg Glu Ser Ile Leu Gly Val Phe Pro Arg Lys Asp Met
305    310

```

```

<210> 5
<211> 321
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature

```

<223> Incyte ID No: 7472037CD1

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 331

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Incyte ID No: 7472039CD1

<400> 6

```

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

```

```

65          70          75
Thr Ser Val Ile Ile Pro Lys Met Leu Ser Asn Phe Leu Ser Arg
80          85          90
Gln His Thr Ile Ser Phe Ala Ala Cys Ile Thr Gln Phe Tyr Phe
95          100         105
Tyr Phe Phe Leu Gly Ala Ser Glu Phe Leu Leu Leu Ala Val Met
110         115         120
Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Cys His Pro Leu Arg Tyr Pro
125         130         135
Leu Leu Met Ser Gly Ala Val Cys Phe Arg Val Ala Leu Ala Cys
140         145         150
Trp Val Gly Gly Leu Val Pro Val Leu Gly Pro Thr Val Ala Val
155         160         165
Ala Leu Leu Pro Phe Cys Lys Gln Gly Ala Val Val Gln His Phe
170         175         180
Phe Cys Asp Ser Gly Pro Leu Leu Arg Leu Ala Cys Thr Asn Thr
185         190         195
Lys Lys Leu Glu Glu Thr Asp Phe Val Leu Ala Ser Leu Val Ile
200         205         210
Val Ser Ser Leu Leu Ile Thr Ala Val Ser Tyr Gly Leu Ile Val
215         220         225
Leu Ala Val Leu Ser Ile Pro Ser Ala Ser Gly Arg Gln Lys Ala
230         235         240
Phe Ser Thr Cys Thr Ser His Leu Ile Val Val Thr Leu Phe Tyr
245         250         255
Gly Ser Ala Ile Phe Leu Tyr Val Arg Pro Ser Gln Ser Gly Ser
260         265         270
Val Asp Thr Asn Trp Ala Val Thr Val Ile Thr Thr Phe Val Thr
275         280         285
Pro Leu Leu Asn Pro Phe Ile Tyr Ala Leu Arg Asn Glu Gln Val
290         295         300
Lys Glu Ala Leu Lys Asp Met Phe Arg Lys Val Val Ala Gly Val
305         310         315
Leu Gly Asn Leu Leu Leu Asp Lys Cys Leu Ser Glu Lys Ala Val
320         325         330
Lys

```

```

<210> 7
<211> 337
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472040CD1

```

```

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

```

```

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

```

```

<210> 8
<211> 1473
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4250893CD1

```

```

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

```

				215					220					225
Lys	Ser	Glu	Lys	Gly	Arg	Pro	Pro	Trp	Ala	Ala	Val	Val	Gly	Thr
				230					235					240
Pro	Pro	Gln	Ala	His	Thr	Ser	Leu	Gln	Pro	His	His	His	Pro	Trp
				245					250					255
Glu	Pro	Ser	Val	Arg	Glu	Ser	Leu	Cys	Ser	Thr	Trp	Pro	Trp	Lys
				260					265					270
Asn	Glu	Asp	Phe	Asn	Gln	Lys	Phe	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Gln
				275					280					285
Arg	Pro	His	Pro	Arg	Ser	Gln	Asp	Pro	Leu	Val	Lys	Arg	Ser	Trp
				290					295					300
Pro	Asp	Tyr	Val	Glu	Glu	Asn	Arg	Gly	His	Leu	Ile	Glu	Ile	Arg
				305					310					315
Asp	Leu	Phe	Gly	Pro	Gly	Leu	Asp	Thr	Gln	Glu	Pro	Arg	Ile	Val
				320					325					330
Ile	Leu	Gln	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu	Ala	Arg
				335					340					345
Gln	Val	Lys	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Gly	Gln	Leu	Tyr	Gly	Asp	Arg
				350					355					360
Phe	Gln	His	Val	Phe	Tyr	Phe	Ser	Cys	Arg	Glu	Leu	Ala	Gln	Ser
				365					370					375
Lys	Val	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Leu	Ile	Gly	Lys	Asp	Gly	Thr	Ala
				380					385					390
Thr	Pro	Ala	Pro	Ile	Arg	Gln	Ile	Leu	Ser	Arg	Pro	Glu	Arg	Leu
				395					400					405
Leu	Phe	Ile	Leu	Asp	Gly	Val	Asp	Glu	Pro	Gly	Trp	Val	Leu	Gln
				410					415					420
Glu	Pro	Ser	Ser	Glu	Leu	Cys	Leu	His	Trp	Ser	Gln	Pro	Gln	Pro
				425					430					435
Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Pro
				440					445					450
Glu	Ala	Ser	Phe	Leu	Ile	Thr	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Leu	Gln	Asn
				455					460					465
Leu	Ile	Pro	Ser	Leu	Glu	Gln	Ala	Arg	Trp	Val	Glu	Val	Leu	Gly
				470					475					480
Phe	Ser	Glu	Ser	Ser	Arg	Lys	Glu	Tyr	Phe	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Thr
				485					490					495
Asp	Glu	Arg	Gln	Ala	Ile	Arg	Ala	Phe	Arg	Leu	Val	Lys	Ser	Asn
				500					505					510
Lys	Glu	Leu	Trp	Ala	Leu	Cys	Leu	Val	Pro	Trp	Val	Ser	Trp	Leu
				515					520					525
Ala	Cys	Thr	Cys	Leu	Met	Gln	Gln	Met	Lys	Arg	Lys	Glu	Lys	Leu
				530					535					540
Thr	Leu	Thr	Ser	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Leu	Cys	Leu	His	Tyr	Leu
				545					550					555
Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Ala	Gln	Pro	Leu	Gly	Pro	Gln	Leu	Arg	Asp
				560					565					570
Leu	Cys	Ser	Leu	Ala	Ala	Glu	Gly	Ile	Trp	Gln	Lys	Lys	Thr	Leu
				575					580					585
Phe	Ser	Pro	Asp	Asp	Leu	Arg	Lys	His	Gly	Leu	Asp	Gly	Ala	Ile
				590					595					600
Ile	Ser	Thr	Phe	Leu	Lys	Met	Gly	Ile	Leu	Gln	Glu	His	Pro	Ile
				605					610					615
Pro	Leu	Ser	Tyr	Ser	Phe	Ile	His	Leu	Cys	Phe	Gln	Glu	Phe	Phe
				620					625					630
Ala	Ala	Met	Ser	Tyr	Val	Leu	Glu	Asp	Glu	Lys	Gly	Arg	Gly	Lys
				635					640					645
His	Ser	Asn	Cys	Ile	Ile	Asp	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Ala	Tyr
				650					655					660
Gly	Ile	His	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ser	Thr	Thr	Arg	Phe	Leu	Leu
				665					670					675
Gly	Leu	Leu	Ser	Asp	Glu	Gly	Glu	Arg	Glu	Met	Glu	Asn	Ile	Phe
				680					685					690
His	Cys	Arg	Leu	Ser	Gln	Gly	Arg	Asn	Leu	Met	Gln	Trp	Val	Pro
				695					700					705
Ser	Leu	Gln	Leu	Leu	Leu	Gln	Pro	His	Ser	Leu	Glu	Ser	Leu	His
				710					715					720

Cys	Leu	Tyr	Glu	Thr	Arg	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Thr	Gln	Val	Met
				725					730					735
Ala	His	Phe	Glu	Glu	Met	Gly	Met	Cys	Val	Glu	Thr	Asp	Met	Glu
				740					745					750
Leu	Leu	Val	Cys	Thr	Phe	Cys	Ile	Lys	Phe	Ser	Arg	His	Val	Lys
				755					760					765
Lys	Leu	Gln	Leu	Ile	Glu	Gly	Arg	Gln	His	Arg	Ser	Thr	Trp	Ser
				770					775					780
Pro	Thr	Met	Val	Val	Leu	Phe	Arg	Trp	Val	Pro	Val	Thr	Asp	Ala
				785					790					795
Tyr	Trp	Gln	Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Lys	Val	Thr	Arg	Asn	Leu
				800					805					810
Lys	Glu	Leu	Asp	Leu	Ser	Gly	Asn	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Ala	Val
				815					820					825
Lys	Ser	Leu	Cys	Lys	Thr	Leu	Arg	Arg	Pro	Arg	Cys	Leu	Leu	Glu
				830					835					840
Thr	Leu	Arg	Leu	Ala	Gly	Cys	Gly	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Cys	Lys
				845					850					855
Asp	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Arg	Ala	Asn	Gln	Thr	Leu	Thr	Glu	Leu
				860					865					870
Asp	Leu	Ser	Phe	Asn	Val	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly	Ala	Lys	His	Leu
				875					880					885
Cys	Gln	Arg	Leu	Arg	Gln	Pro	Ser	Cys	Lys	Leu	Gln	Arg	Leu	Gln
				890					895					900
Leu	Val	Ser	Cys	Gly	Leu	Thr	Ser	Asp	Cys	Cys	Gln	Asp	Leu	Ala
				905					910					915
Ser	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys	Glu	Leu	Asp	Leu	Gln
				920					925					930
Gln	Asn	Asn	Leu	Asp	Asp	Val	Gly	Val	Arg	Leu	Leu	Cys	Glu	Gly
				935					940					945
Leu	Arg	His	Pro	Ala	Cys	Lys	Leu	Ile	Arg	Leu	Gly	Leu	Asp	Gln
				950					955					960
Thr	Thr	Leu	Ser	Asp	Glu	Met	Arg	Gln	Glu	Leu	Arg	Ala	Leu	Glu
				965					970					975
Gln	Glu	Lys	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Phe	Ser	Arg	Arg	Lys	Pro	Ser
				980					985					990
Val	Met	Thr	Pro	Thr	Glu	Gly	Leu	Asp	Thr	Gly	Glu	Met	Ser	Asn
				995					1000					1005
Ser	Thr	Ser	Ser	Leu	Lys	Arg	Gln	Arg	Leu	Gly	Ser	Glu	Arg	Ala
				1010					1015					1020
Ala	Ser	His	Val	Ala	Gln	Ala	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Val	Ser
				1025					1030					1035
Lys	Ile	Phe	Pro	Ile	Ala	Glu	Ile	Ala	Glu	Glu	Ser	Ser	Pro	Glu
				1040					1045					1050
Val	Val	Pro	Val	Glu	Leu	Leu	Cys	Val	Pro	Ser	Pro	Ala	Ser	Gln
				1055					1060					1065
Gly	Asp	Leu	His	Thr	Lys	Pro	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp	Asp	Phe	Trp
				1070					1075					1080
Gly	Pro	Thr	Gly	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Val	Val	Asp	Lys	Glu	Lys
				1085					1090					1095
Asn	Leu	Tyr	Arg	Val	His	Phe	Pro	Val	Ala	Gly	Ser	Tyr	Arg	Trp
				1100					1105					1110
Pro	Asn	Thr	Gly	Leu	Cys	Phe	Val	Met	Arg	Glu	Ala	Val	Thr	Val
				1115					1120					1125
Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Val	Trp	Asp	Gln	Phe	Leu	Gly	Glu	Ile	Asn
				1130					1135					1140
Pro	Gln	His	Ser	Trp	Met	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Asp	Ile	Lys
				1145					1150					1155
Ala	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Glu	Ala	Val	His	Leu	Pro	His	Phe	Val
				1160					1165					1170
Ala	Leu	Gln	Gly	Gly	His	Val	Asp	Thr	Ser	Leu	Phe	Gln	Met	Ala
				1175					1180					1185
His	Phe	Lys	Glu	Glu	Gly	Met	Leu	Leu	Glu	Lys	Pro	Ala	Arg	Val
				1190					1195					1200
Glu	Leu	His	His	Ile	Val	Leu	Glu	Asn	Pro	Ser	Phe	Ser	Pro	Leu
				1205					1210					1215
Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Met	Ile	His	Asn	Ala	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro

1220 1225 1230  
 Val Thr Ser Val Val Leu Leu Tyr His Arg Val His Pro Glu Glu  
 1235 1240 1245  
 Val Thr Phe His Leu Tyr Leu Ile Pro Ser Asp Cys Ser Ile Arg  
 1250 1255 1260  
 Lys Ala Ile Asp Asp Leu Glu Met Lys Phe Gln Phe Val Arg Ile  
 1265 1270 1275  
 His Lys Pro Pro Pro Leu Thr Pro Leu Tyr Met Gly Cys Arg Tyr  
 1280 1285 1290  
 Thr Val Ser Gly Ser Gly Ser Gly Met Leu Glu Ile Leu Pro Lys  
 1295 1300 1305  
 Glu Leu Glu Leu Cys Tyr Arg Ser Pro Gly Glu Asp Gln Leu Phe  
 1310 1315 1320  
 Ser Glu Ser Tyr Val Gly His Leu Gly Ser Gly Ile Arg Leu Gln  
 1325 1330 1335  
 Val Lys Asp Lys Lys Asp Glu Thr Leu Val Trp Glu Ala Leu Val  
 1340 1345 1350  
 Lys Pro Gly Asp Leu Met Pro Ala Thr Thr Leu Ile Pro Pro Ala  
 1355 1360 1365  
 Arg Ile Ala Val Pro Ser Pro Leu Asp Ala Pro Gln Leu Leu His  
 1370 1375 1380  
 Phe Val Asp Gln Tyr Arg Glu Gln Leu Ile Ala Arg Val Thr Ser  
 1385 1390 1395  
 Val Glu Val Val Leu Asp Lys Leu His Gly Gln Val Leu Ser Gln  
 1400 1405 1410  
 Glu Gln Tyr Glu Arg Val Leu Ala Glu Asn Thr Arg Pro Ser Gln  
 1415 1420 1425  
 Met Arg Lys Leu Phe Ser Leu Ser Gln Ser Trp Asp Arg Lys Cys  
 1430 1435 1440  
 Lys Asp Gly Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Glu Thr His Pro His Leu  
 1445 1450 1455  
 Ile Met Glu Leu Trp Glu Lys Gly Ser Lys Lys Gly Leu Leu Pro  
 1460 1465 1470  
 Leu Ser Ser

<210> 9

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Incyte ID No: 6726656CD1

<400> 9

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

```

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

```

<210> 10

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Incyte ID No: 7472062CD1

<400> 10

```

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

```

```

                245                250                255
Thr Cys Ser Glu Lys His Ile Ser Glu Leu Ile Leu Val Leu Ile
                260                265                270
Ser Ser Phe Asn Val Phe Phe Ala Leu Leu Val Thr Leu Ile Ser
                275                280                285
Tyr Leu Phe Ile Leu Ile Thr Ile Leu Lys Arg His Thr Gly Lys
                290                295                300
Gly Tyr Gln Lys Pro Leu Ser Thr Cys Gly Ser His Leu Ile Ala
                305                310                315
Ile Phe Leu Phe Tyr Ile Thr Val Ile Ile Met Tyr Ile Arg Pro
                320                325                330
Ser Ser Ser His Ser Met Asp Thr Asp Lys Ile Ala Ser Val Phe
                335                340                345
Tyr Thr Met Ile Ile Pro Met Leu Ser Pro Ile Val Tyr Thr Leu
                350                355                360
Arg Asn Lys Asp Val Lys Asn Ala Phe Met Lys Val Val Glu Lys
                365                370                375
Ala Lys Tyr Ser Leu Asp Ser Val Phe
                380

```

```

<210> 11
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472067CD1

```

```

<400> 11
Met Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Ser Asn Ser Ser Ser Met Asn
 1                5                10                15
Val Ser Phe Ala His Leu His Phe Ala Gly Gly Tyr Leu Pro Ser
 20                25                30
Asp Ser Gln Asp Trp Arg Thr Ile Ile Pro Ala Leu Leu Val Ala
 35                40                45
Val Cys Leu Val Gly Phe Val Gly Asn Leu Cys Val Ile Gly Ile
 50                55                60
Leu Leu His Asn Ala Trp Lys Gly Lys Pro Ser Met Ile His Ser
 65                70                75
Leu Ile Leu Asn Leu Ser Leu Ala Asp Leu Ser Leu Leu Leu Phe
 80                85                90
Ser Ala Pro Ile Arg Ala Thr Ala Tyr Ser Lys Ser Val Trp Asp
 95                100                105
Leu Gly Trp Phe Val Cys Lys Ser Ser Asp Trp Phe Ile His Thr
 110                115                120
Cys Met Ala Ala Lys Ser Leu Thr Ile Val Val Val Ala Lys Val
 125                130                135
Cys Phe Met Tyr Ala Ser Asp Pro Ala Lys Gln Val Ser Ile His
 140                145                150
Asn Tyr Thr Ile Trp Ser Val Leu Val Ala Ile Trp Thr Val Ala
 155                160                165
Ser Leu Leu Pro Leu Pro Glu Trp Phe Phe Ser Thr Ile Arg His
 170                175                180
His Glu Gly Val Glu Met Cys Leu Val Asp Val Pro Ala Val Ala
 185                190                195
Glu Glu Phe Met Ser Met Phe Gly Lys Leu Tyr Pro Leu Leu Ala
 200                205                210
Phe Gly Leu Pro Leu Phe Phe Ala Ser Phe Tyr Phe Trp Arg Ala
 215                220                225
Tyr Asp Gln Cys Lys Lys Arg Gly Thr Lys Thr Gln Asn Leu Arg
 230                235                240
Asn Gln Ile Arg Ser Lys Gln Val Thr Val Met Leu Leu Ser Ile
 245                250                255
Ala Ile Ile Ser Ala Leu Leu Trp Leu Pro Glu Trp Val Ala Trp
 260                265                270
Leu Trp Val Trp His Leu Lys Ala Ala Gly Pro Ala Pro Pro Gln

```

				275						280				285
Gly	Phe	Ile	Ala	Leu	Ser	Gln	Val	Leu	Met	Phe	Ser	Ile	Ser	Ser
				290						295				300
Ala	Asn	Pro	Leu	Ile	Phe	Leu	Val	Met	Ser	Glu	Glu	Phe	Arg	Glu
				305						310				315
Gly	Leu	Lys	Gly	Val	Trp	Lys	Trp	Met	Ile	Thr	Lys	Lys	Pro	Pro
				320						325				330
Thr	Val	Ser	Glu	Ser	Gln	Glu	Thr	Pro	Ala	Gly	Asn	Ser	Glu	Gly
				335						340				345
Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Pro
				350						355				360
Glu	Lys	Glu	Lys	Pro	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Gly	Lys	Gly	Lys	Thr
				365						370				375
Glu	Lys	Ala	Glu	Ile	Pro	Ile	Leu	Pro	Asp	Val	Glu	Gln	Phe	Trp
				380						385				390
His	Glu	Arg	Asp	Thr	Val	Pro	Ser	Val	Gln	Asp	Asn	Asp	Pro	Ile
				395						400				405
Pro	Trp	Glu	His	Glu	Asp	Gln	Glu	Thr	Gly	Glu	Gly	Val	Lys	
				410						415				

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 314

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Incyte ID No: 7472072CD1

&lt;400&gt; 12

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

```

                275                280                285
Asn Pro Leu Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Pro Glu Val Trp Met Ala
                290                295                300
Leu Val Lys Val Leu Ser Arg Ala Gly Leu Arg Gln Met Cys
                305                310

```

```

<210> 13
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472074CD1

```

```

<400> 13
Met Ala Ser Arg Tyr Val Ala Val Gly Met Ile Leu Ser Gln Thr
 1                    5                    10                    15
Val Val Gly Val Leu Gly Ser Phe Ser Val Leu Leu His Tyr Leu
 20                    25                    30
Ser Phe Tyr Cys Thr Gly Cys Arg Leu Arg Ser Thr Asp Leu Ile
 35                    40                    45
Val Lys His Leu Ile Val Ala Asn Phe Leu Ala Leu Arg Cys Lys
 50                    55                    60
Gly Val Pro Gln Thr Met Ala Ala Phe Gly Val Arg Tyr Phe Leu
 65                    70                    75
Asn Ala Leu Gly Cys Lys Leu Val Phe Tyr Leu His Arg Val Gly
 80                    85                    90
Arg Gly Val Ser Ile Gly Thr Thr Cys Leu Leu Ser Val Phe Gln
 95                    100                   105
Val Ile Thr Val Ser Ser Arg Lys Ser Arg Trp Ala Lys Leu Lys
110                   115                   120
Glu Lys Ala Pro Lys His Val Gly Phe Ser Val Leu Leu Cys Trp
125                   130                   135
Ile Val Cys Met Leu Val Asn Ile Ile Phe Pro Met Tyr Val Thr
140                   145                   150
Gly Lys Trp Asn Tyr Thr Asn Ile Thr Val Asn Glu Asp Leu Gly
155                   160                   165
Tyr Cys Ser Gly Gly Gly Asn Asn Lys Ile Ala Gln Thr Leu Arg
170                   175                   180
Ala Met Leu Leu Ser Phe Pro Asp Val Leu Cys Leu Gly Leu Met
185                   190                   195
Leu Trp Val Ser Ser Ser Met Val Cys Ile Leu His Arg His Lys
200                   205                   210
Gln Arg Val Gln His Ile Asp Arg Ser Asp Leu Ser Pro Arg Ala
215                   220                   225
Ser Pro Glu Asn Arg Ala Thr Gln Ser Ile Leu Ile Leu Val Ser
230                   235                   240
Thr Phe Val Ser Ser Tyr Thr Leu Ser Cys Leu Phe Gln Val
245                   250

```

```

<210> 14
<211> 362
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472077CD1

```

```

<400> 14
Met Tyr Lys Asp Cys Ile Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Phe Leu Leu
 1                    5                    10                    15
Cys Asp Ala Glu Gly Pro Trp Gly Ile Ile Leu Glu Ser Leu Ala
 20                    25                    30
Ile Leu Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu
 35                    40                    45

```

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

<210> 15  
 <211> 370  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 7472082CD1

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

```

Phe Leu Gly Ile Cys Val Val Thr Val Val Gly Asn Leu Gly Met
  95                                     100                             105
Ile Thr Leu Ile Gly Leu Ser Ser His Leu His Thr Pro Met Tyr
 110                                     115                             120
Tyr Phe Leu Ser Ser Leu Ser Phe Ile Asp Phe Cys His Ser Thr
 125                                     130                             135
Val Ile Thr Pro Lys Met Leu Val Asn Phe Ala Thr Glu Lys Asn
 140                                     145                             150
Ile Ile Ser Tyr Pro Glu Cys Met Ala Gln Leu Tyr Leu Phe Ser
 155                                     160                             165
Ile Phe Ala Ile Ala Glu Cys His Met Leu Ala Ala Met Ala Tyr
 170                                     175                             180
Asp Cys Tyr Val Ala Ile Cys Ser Pro Leu Leu Tyr Asn Val Ile
 185                                     190                             195
Met Ser Tyr His His Cys Phe Trp Leu Thr Val Gly Val Tyr Ile
 200                                     205                             210
Leu Gly Ile Leu Gly Ser Thr Ile His Thr Ser Phe Met Leu Arg
 215                                     220                             225
Leu Phe Leu Cys Lys Thr Asn Val Ile Asn His Tyr Phe Cys Asp
 230                                     235                             240
Leu Phe Pro Leu Leu Gly Leu Ser Cys Ser Ser Thr Tyr Ile Asn
 245                                     250                             255
Glu Leu Leu Val Leu Val Leu Ser Ala Phe Asn Ile Leu Met Pro
 260                                     265                             270
Ala Leu Thr Ile Leu Ala Ser Tyr Ile Phe Ile Ile Ala Ser Ile
 275                                     280                             285
Leu Arg Ile His Ser Thr Glu Gly Arg Ser Lys Ala Phe Ser Thr
 290                                     295                             300
Cys Ser Ser His Ile Leu Ala Val Ala Val Phe Phe Gly Ser Ala
 305                                     310                             315
Ala Phe Met Tyr Leu Gln Pro Ser Ser Val Ser Ser Met Asp Gln
 320                                     325                             330
Arg Lys Val Ser Ser Val Phe Tyr Thr Thr Ile Val Pro Met Leu
 335                                     340                             345
Asn Pro Leu Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Lys Leu Ala
 350                                     355                             360
Val Lys Lys Ile Leu His Gln Thr Ala Cys
 365                                     370

```

<210> 16

<211> 319

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Incyte ID No: 7472128CD1

<400> 16

```

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

```

```

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

```

```

<210> 17
<211> 312
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472134CD1

```

```

<400> 17
Met Asp Thr Gly Asn Trp Ser Gln Val Ala Glu Phe Ile Ile Leu
1 5 10 15
Gly Phe Pro His Leu Gln Gly Val Gln Ile Tyr Leu Phe Leu Leu
20 25 30
Leu Leu Leu Ile Tyr Leu Met Thr Val Leu Gly Asn Leu Leu Ile
35 40 45
Phe Leu Val Val Cys Leu Asp Ser Arg Leu His Thr Pro Met Tyr
50 55 60
His Phe Val Ser Ile Leu Ser Phe Ser Glu Leu Gly Tyr Thr Ala
65 70 75
Ala Thr Ile Pro Lys Met Leu Ala Asn Leu Leu Ser Glu Lys Lys
80 85 90
Thr Ile Ser Phe Ser Gly Cys Leu Leu Gln Ile Tyr Phe Phe His
95 100 105
Ser Leu Gly Ala Thr Glu Cys Tyr Leu Leu Thr Ala Met Ala Tyr
110 115 120
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Cys Arg Pro Leu His Tyr Pro Thr Leu
125 130 135
Met Thr Pro Thr Leu Cys Ala Glu Ile Ala Ile Gly Cys Trp Leu
140 145 150
Gly Gly Leu Ala Gly Pro Val Val Glu Ile Ser Leu Ile Ser Arg
155 160 165
Leu Pro Phe Cys Gly Pro Asn Arg Ile Gln His Val Phe Cys Asp
170 175 180
Phe Pro Pro Val Leu Ser Leu Ala Cys Thr Asp Thr Ser Ile Asn
185 190 195
Val Leu Val Asp Phe Val Ile Asn Ser Cys Lys Ile Leu Ala Thr
200 205 210
Phe Leu Leu Ile Leu Cys Ser Tyr Val Gln Ile Ile Cys Thr Val
215 220 225

```

Leu Arg Ile Pro Ser Ala Ala Gly Lys Arg Lys Ala Ile Ser Thr  
 230 235 240  
 Cys Ala Ser His Phe Thr Val Val Leu Ile Phe Tyr Gly Ser Ile  
 245 250 255  
 Leu Ser Met Tyr Val Gln Leu Lys Lys Ser Tyr Ser Leu Asp Tyr  
 260 265 270  
 Asp Gln Ala Leu Ala Val Val Tyr Ser Val Leu Thr Pro Phe Leu  
 275 280 285  
 Asn Pro Phe Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Glu Ile Lys Glu Ala  
 290 295 300  
 Val Arg Arg Gln Leu Lys Arg Ile Gly Ile Leu Ala  
 305 310

<210> 18  
 <211> 321  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 7472136CD1

<400> 18  
 Met Asn Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Thr Val Glu Ser Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Thr Val His Thr Ala Tyr Leu Val Leu  
 20 25 30  
 Ser Ser Leu Ala Met Phe Thr Cys Leu Cys Gly Met Ala Gly Asn  
 35 40 45  
 Ser Met Val Ile Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met His Arg Asn Pro  
 50 55 60  
 Phe Cys Ile Tyr Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Phe  
 65 70 75  
 Leu Phe Ser Met Ala Ser Thr Leu Ser Leu Glu Thr Gln Pro Leu  
 80 85 90  
 Val Asn Thr Thr Asp Lys Val His Glu Leu Met Lys Arg Leu Met  
 95 100 105  
 Tyr Phe Ala Tyr Thr Val Gly Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser  
 110 115 120  
 Thr Gln Arg Cys Leu Ser Val Leu Phe Pro Ile Trp Phe Lys Cys  
 125 130 135  
 His Arg Pro Arg His Leu Ser Ala Trp Val Cys Gly Leu Leu Trp  
 140 145 150  
 Thr Leu Cys Leu Leu Met Asn Gly Leu Thr Ser Ser Phe Cys Ser  
 155 160 165  
 Lys Phe Leu Lys Phe Asn Glu Asp Arg Cys Phe Arg Val Asp Met  
 170 175 180  
 Val Gln Ala Ala Leu Ile Met Gly Val Leu Thr Pro Val Met Thr  
 185 190 195  
 Leu Ser Ser Leu Thr Leu Phe Val Trp Val Arg Arg Ser Ser Gln  
 200 205 210  
 Gln Trp Arg Arg Gln Pro Thr Arg Leu Phe Val Val Val Leu Ala  
 215 220 225  
 Ser Val Leu Val Phe Leu Ile Cys Ser Leu Pro Leu Ser Ile Tyr  
 230 235 240  
 Trp Phe Val Leu Tyr Trp Leu Ser Leu Pro Pro Glu Met Gln Val  
 245 250 255  
 Leu Cys Phe Ser Leu Ser Arg Leu Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
 260 265 270  
 Ala Asn Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Arg Arg Ser His  
 275 280 285  
 Arg Leu Pro Thr Arg Ser Leu Gly Thr Val Leu Gln Gln Ala Leu  
 290 295 300  
 Arg Glu Glu Pro Glu Leu Glu Gly Gly Glu Thr Pro Thr Val Gly  
 305 310 315  
 Thr Asn Glu Met Gly Ala  
 320

<210> 19  
 <211> 316  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 7472142CD1

<400> 19  
 Met Gln Gly Glu Asn Phe Thr Ile Trp Ser Ile Phe Phe Leu Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Ser Gln Tyr Pro Gly Leu Glu Val Val Leu Phe Val Phe  
 20 25 30  
 Ser Leu Val Met Tyr Leu Thr Thr Leu Leu Gly Asn Ser Thr Leu  
 35 40 45  
 Ile Leu Ile Thr Ile Leu Asp Ser Arg Leu Lys Thr Pro Met Tyr  
 50 55 60  
 Leu Phe Leu Gly Asn Leu Ser Phe Met Asp Ile Cys Tyr Thr Ser  
 65 70 75  
 Ala Ser Val Pro Thr Leu Leu Val Asn Leu Leu Ser Ser Gln Lys  
 80 85 90  
 Thr Ile Ile Phe Ser Gly Cys Ala Val Gln Met Tyr Leu Ser Leu  
 95 100 105  
 Ala Met Gly Ser Thr Glu Cys Val Leu Leu Ala Val Met Ala Tyr  
 110 115 120  
 Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn Pro Leu Arg Tyr Ser Ile Ile  
 125 130 135  
 Met Asn Arg Cys Val Cys Ala Arg Met Ala Thr Val Ser Trp Val  
 140 145 150  
 Thr Gly Cys Leu Thr Ala Leu Leu Glu Thr Ser Phe Ala Leu Gln  
 155 160 165  
 Ile Pro Leu Cys Gly Asn Leu Ile Asp His Phe Thr Cys Glu Ile  
 170 175 180  
 Leu Ala Val Leu Lys Leu Ala Cys Thr Ser Ser Leu Leu Met Asn  
 185 190 195  
 Thr Ile Met Leu Val Val Ser Ile Leu Leu Leu Pro Ile Pro Met  
 200 205 210  
 Leu Leu Val Cys Ile Ser Tyr Ile Phe Ile Leu Ser Thr Ile Leu  
 215 220 225  
 Arg Ile Thr Ser Ala Glu Gly Arg Asn Lys Ala Phe Ser Thr Cys  
 230 235 240  
 Gly Ala His Leu Thr Val Val Ile Leu Tyr Tyr Gly Ala Ala Leu  
 245 250 255  
 Ser Met Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Ser Asn Ala Gln Lys Ile Asp  
 260 265 270  
 Lys Ile Ile Ser Leu Leu Tyr Gly Val Leu Thr Pro Met Leu Asn  
 275 280 285  
 Pro Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Glu Val Lys Asp Ala Met  
 290 295 300  
 Lys Lys Leu Leu Gly Lys Ile Thr Leu His Gln Thr His Glu His  
 305 310 315  
 Leu

<210> 20  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 7472171CD1

<400> 20  
 Met Glu Pro Leu Asn Arg Thr Glu Val Ser Glu Phe Phe Leu Lys  
 1 5 10 15

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

<210> 21  
 <211> 313  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 7472172CD1

<400> 21  
 Met Gly Asn Trp Ser Thr Val Thr Glu Ile Thr Leu Ile Ala Phe  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Leu Leu Glu Ile Arg Ile Ser Leu Phe Val Val Leu Val  
 20 25 30  
 Val Thr Tyr Thr Leu Thr Ala Thr Gly Asn Ile Thr Ile Ile Ser  
 35 40 45  
 Leu Ile Trp Ile Asp His Arg Leu Gln Thr Pro Met Tyr Phe Phe  
 50 55 60  
 Leu Ser Asn Leu Ser Phe Leu Asp Ile Leu Tyr Thr Thr Val Ile  
 65 70 75  
 Thr Pro Lys Leu Leu Ala Cys Leu Leu Gly Glu Glu Lys Thr Ile  
 80 85 90  
 Ser Phe Ala Gly Cys Met Ile Gln Thr Tyr Phe Tyr Phe Phe Leu  
 95 100 105

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

<210> 22  
 <211> 1413  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 7472033CB1

<220>  
 <221> unsure  
 <222> 176, 383, 927  
 <223> a, t, c, g, or other

<400> 22  
 atgaatcaga cggagcccgc ccagctggca gatggggagc atctgagtgg atacgccagc 60  
 agcagcaaca gcgtgcgcta tctggacgac cggcatccgc tggactacct tgacctgggc 120  
 acgggtgcacg cctcaacac cactgccatc aacacctcgg atctgaaatga gactgngagc 180  
 aggccgctgg acccgggtct tatcgatagg ttcctgagca acagggcggg ggacagcccc 240  
 tggtagccaca tgctcatcag catgtacggc gtgctaatac tcttcggcgc cctaggaac 300  
 acccttgggtt gttatagccc gtcacccgga agcccatcat ggcactgct cgcaatctgg 360  
 ttcacatcctca acctggccat atnccggccaa agcaagtgtg agtctcatcc gagcggactt 420  
 tcagacctac ttttatgcct agtcaccatg ccgctgacct tgatggagat cctgtccaag 480  
 tactggccct acggctcctg ctccatcctg tgcaaaaacga ttgccatgct gcaggcactt 540  
 tgtattttcg tgtcgacaat atccataacg gccattgcct tcgacagata tcagggtgatc 600  
 gtgtaccoca cgcgggacag cctgcagttc gtgggcggcg tgacgatcct ggcggggatc 660  
 tgggcaactgg cactgctgct ggccctgcgg ctgttctgtct acaaggagct gatcaacaca 720  
 gacacgcggg cactcctgca gcagatcggc ctgcaggaca cgatccgta ctgcattgag 780  
 gactggccaa gtgcacacgg gcgctctctac tactcgatct tctcgtctgt cgtacaatac 840  
 ctgggtccca tcttgatcgt ctccgtggca tacttcggga tctacaacaa gctgaagagc 900  
 cgcatacccg tgggtgctgt gcaggcncgg aaggtggagc gggggcggcg gatgaagcgc 960  
 accaactgcc tactgatcag catcgccatc atctttggcg tttcttggct gccgcttgac 1020  
 tttttcaacc tgtacgcgga catggagcgc tcgcccgtca ctcagagcat gctagtccgc 1080  
 tacgccatct gccacatgat cggcatgagc tcgcctgctt ccaaccctgt gctctacggc 1140  
 tggctcaacg acaacttccg taaagaaatt caagaactgc tctgcgcttg ctcagacact 1200  
 aatgtggctc ttaacgggtca cacgacaggc tgcaacgtcc aggcggcggc gcgcaggcgt 1260  
 cgcaagtatg ggcgcggaat tctccaaagg cgaactcaag ctgctggggc aggcggcggc 1320  
 agagcggtag cgcggcgggg gaggcggtct ggcggccacc gacttcatga ccggcaccac 1380

gaggggggac tgcgcaacat agttcatcat tga 1413

<210> 23  
<211> 1076  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472034CB1

<400> 23  
tctaccctcc tgagaaggaa cagagaaaca attctggtaa tattacaaaa caaggttctt 60  
taacacctcc gaaggatcaa accagctcac cagcaatgga tccaaaccaa gatgaaatct 120  
ctgaattacc agaaaaagaa ttcagaagat caattattaa gctgatcaaa gaggcaccag 180  
aaaaagggat tccaggttta gaggaaagcc agcactggat tgcactgccc ctgggcatcc 240  
tttacctect tgctttagtg ggcaatgta ccattctctt catcatctgg atggacccat 300  
ccttgcacca atctatgtac ctcttctctg ccatgctagc tgccatcgac ctggttctgg 360  
cctcctccac tgcacccaaa gcccttgccg tgctctgggt tcatgcccac gagattgggt 420  
acatctgtctg cctgatccag atgttcttca tccatgcatt ctctccatg gagtcagggg 480  
tacttgtggc catggctctg gatcgctatg tagccatttg tcacccttg caccattcca 540  
caatctcgca tccagggtgc ataggggcga tcggaaatggt ggtgctggtg aggggattac 600  
tactccttat ccccttcccc attttgttgg gaacacttat cttctgccaa gccaccatca 660  
taggcoatgc ctattgtgaa cataatggctg ttgtgaaact tgcctgctca gaaaccacag 720  
tcaatcgagc ttatgggctg actatggcct tgcttgtgat tgggctggat gttctggcca 780  
ttgggtgttc ctatgcccac atcctccagg cagtgtgtaa ggtaccaggg agtgaaggccc 840  
gacttaaggc ctttagcaca tgtggctctc atatttgggt cactctggtc ttctatgtcc 900  
ctggaatttt ctcttctctc actcaccgct ttggatcatca tgtaccocat catgtccatg 960  
ttcttctggc cacacgggat ctctcatgac cacctgcgct caatcctctt gtctatggag 1020  
tgaagactca gcagatccgc cagcgagtgc tcagagtgtt tacacaaaag gattga 1076

<210> 24  
<211> 948  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472035CB1

<400> 24  
atggaaaccc ctgctctctt cctccttgtg ggtatcccag gactgcaatc ttcacatctt 60  
tggctggcta tctcactgag tgccatgtac atcatagccc tgttaggaaa caccatcctc 120  
gtgactgcaa tctggatgga ttccactcgg catgagccca tgtattgctt tctgtgtggt 180  
ctggctgctg tggacattgt tatggcctcc togggtgtac ccaagatggt gagcatcttc 240  
tgctcaggag acagctcaat cagctttagt gcttgtttca ctcagatggt ttttctccac 300  
ttagccacag ctgtggagac ggggctgctg ctgaccatgg cttttgaccg ctatgtagcc 360  
atctgcaagc ctctacacta caagagaatt ctacagcctc aagtgatgct gggaatgagt 420  
atggccatca ccatcagagc tatcatagcc ataactccac tgagttggat ggtgagtcct 480  
ctacccttct gtggctccaa tgtggttgtc cactcctact gtgagcacat agctttggcc 540  
aggtttagcat gtgtgaccc cgtgcccagc agtctctaca gtctgattgg ttctctcttt 600  
atgggtggct ctgatgtggc cttcattgct gcctcctata tcttaattct caaggcagta 660  
tttggctctc cctcaaagac tgctcagttg aaagcattaa gcacatgtgg ctcccagtg 720  
ggggttatgg ctttgtacta tctacctggg atggcatoca tctatgccc ctggttgggg 780  
caggatgtag tgccttgcac caccacaagtc ctgctagctg acctgtacgt gatcatccca 840  
gccaccttaa atcccacat ctatggcatg aggacaaaac aactgcccga gagaatatgg 900  
agttatctga tgcattgctt ctttgaccat tccaaacctg gttcatga 948

<210> 25  
<211> 945  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472036CB1

```

<400> 25
atgtcagcct ccaatatcac cttaacacat ccaactgcct tcttggttggg ggggattcca 60
ggcctggaac acctgcacat ctggatctcc atccccctct gcttagcata tacactggcc 120
ctgcttgtaa actgcactct ccttctcacc atcccaggctg atgcagccct ccatgaacce 180
atgtacctct ttctggccat gttggcagcc atcgacctgg tcttttctc ctcagcactg 240
cccaaaatgc ttgccatatt ctggttcagg gatcgggaga taaacttctt tgccctgtctg 300
gcccagatgt tcttctctca ctctctctcc atcatggagt cagcagtgtc gctggccatg 360
gcctttgacc gctatgtggc tatctgcaag ccaactgcact acaccaaggt cctgactggg 420
tccctcatca ccaagattgg catggctgct gtggcccggg ctgtgacact aatgactcca 480
ctccccctcc tgcctgagatg ttccactac tgccgaggcc cagtgatcgc tcactgctac 540
tgtgaacaca tggctgtggg gaggctggcg tgtggggaca ctagcttcaa caatctctat 600
ggcatcgtcg tggccatgtt tattgtggg ttggacctgc tcttgttat cctgtcttat 660
atctttatcc ttcaggcagt tctactgctt gcctctcagg aggcccgcta caaggcattt 720
gggacatgtg tctctcatat aggtgccatc ttagcctctc acacaactgt ggtcactctc 780
tcagtcacgc ccgctgtagc ccgctatgct gccctcatg tccacatctc ccttgccaat 840
ttctatctgc tcttcccacc catggtcaat cccataatct atggtgtcaa gaccaagcaa 900
atccgtgaga gcatcttggg agtattccca agaaaggata tgtag 945

```

```

<210> 26
<211> 966
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472037CB1

```

```

<400> 26
atggctcacc agggcctga gaagcagcag gacaatggga cctggctggt gacagagtcc 60
ctgctggtgg gattctccaa cctcccagaa ctgaggccca ctctcttcat cttgttctc 120
ctcacctacc tggtcacact cagtggcaat gccaccatca tcaccatcat ccaggtagat 180
cgcactctcc acacacctat gtaccgcttc ctggccgtgc tctcccctc tgagacctgc 240
tacacactgg tcaccatccc caatatgctg gctcatctgc tgatggagag ccaggccatc 300
tccatcggcg gctgtcggc ccagatgttc ttcttctag gcttgggtg cagccattgt 360
ttctctctta cctgatggg ctatgacagg tatgtggcca tctgccatcc cttgctgtac 420
tctgtgatca tgagaccac cgtctgcctg tgtttgggag ccttggtttt ctgctctggt 480
ttctcagtgg ctttgattga gacctgcatg atcttctct caccctctc tggecaggc 540
catgtggagc acttctctc tgacattgcg cctgtgctga agctcagctg tgatgagagc 600
tcactcaagg gacttggcat cttcttctg ageatctctg tgggtctggt ctcttctctc 660
ttcattctcc tctctacgc cttoattgtg gctgccattg tgaggatccc ttggcctct 720
ggccggcgca aagccttctc tacctgcgca gccaccctca cgggtggtcat cgtacatttt 780
ggttgtgcct ccatcateta cctgaggccg gactctgggg ctaatccctc ccaggaccgc 840
ctggtggcgg tgttctacac cgtggtgaca ccgctgctga accctgtggt ttacacctg 900
aggaacaagg aggtgagggt agcgtgagg aaaaacctgg cacggggctg tggagcattt 966
aagtaa

```

```

<210> 27
<211> 996
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472039CB1

```

```

<400> 27
atgagtcctg atgggaacca cagtatgtat ccaacagagt tcttctctggc agggctccca 60
aatctcaaca gcgcaagagt ggaattatct tctgtgttcc tcttctgcta tctctgaa 120
ctgacaggca atgtgttgat tgtgggggtg gtaagggctg atactcgact acagaccct 180
atgtactctt ttctgggtaa cctgtctctg cttagagata tgctcacttc tgtcatcatt 240
ccaaagatgc tgagcaattt cctctcaagg caacacacta tttcttctgc tgcattgata 300
acccaattct atttctactt ctttctcggg gcctccagat tcttactggt ggtgtctatg 360
tctgctgctc gctactggc catctgtcat cctctgctg acccttctc catgagtggg 420
gctgtgtgct ttctgtgtgc cttggcctgc tgggtggggg gactcgtccc tgtgttggg 480
cccacagtgg ctgtggcctt gcttctcttc tgtaagcagg gtgctgtggt acagcacttc 540
ttctgagaca gtggcccact gctcgcctg gcttgacca acaccaagaa gctggaggag 600
actgactttg tcttggctc cctcgtcatt gtatcttctc tgcctgatac tctgtgtctc 660

```

```

tacggcctca ttgtgctggc agtccctgagc atccccctctg cttcaggccg tcagaaggcc 720
ttctctacct gtacctccca cttgatagtg gtgacctctt tctatggaag tgccatnttt 780
ctctatgtgc ggccatcgca gagggtgtct gtggacacta actgggcagt gacagtaata 840
acgacatttg tgacaccact gttgaatcca ttcctctatg ccttacgtaa tgagcaagtc 900
aaggaaagctt tgaaggacat gtttaggaag gtagtggcag gcgtttttagg gaatctttta 960
cttgataaat gtctcagtga gaaagcagta aagtaa 996

```

```

<210> 28
<211> 1014
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7472040CB1

```

```

<400> 28
atggggaacg attctgtcag ctacgagtat ggggattaca ggcacctctc ggaccgccct 60
gtggactgcc tggatggcgc ctgcctggcc atcgaccgcc tgcgcgtggc cccgctccca 120
ctgtatgccg ccactcttct ggtgggggtg ccgggcaatg ccatggtggc ctgggtggct 180
gggaaggtgg cccgceggag ggtgggtgcc acctggttgc tccacctggc cgtggcggat 240
ttgctgtgct gtttgtctct gcccatcctg gcagtgccca ttgcccgtgg aggccactgg 300
ccgtatggtg cagtgggctg tccggcgctg ccctccatca tctgtctgac catgtatgcc 360
agcgtcctgc tctggcagc tctcagtgcc gacctctgct tccctggctc cgggctggcc 420
tgggtggtcta cggttcagcg ggcgtgcccg gtgcagggtg cctgtggggc agcctggaca 480
ctggccttgc tgcctaccgt gccctccgcc atctaccgcc ggctgcacca ggagcacttc 540
ccagcccggc tgcagttgtt ggtggactac ggcggctcct ccagcaccga gaatgcccgt 600
actgccaatc cgtttctttt tggcttctct gggcccctgg tggccgtggc cagctgccac 660
agtgcctccc tgtgctgggc agcccgaagc tgcggccgcc tgggacacag cattgtgggt 720
gggttttttg tctgtgggc accctaccac ctgctggggc tgggtctcac tgtggcggcc 780
ccgaactccc cactcctggc cagggccctg cgggctgaac cctcatcgt gggccttggc 840
ctcgcctcaa gctgcctcaa tcccattgct ttccctgtatt ttgggagggc tcaactccgc 900
cggctactgc cagctgctg tcaactgggc ctgagggagt cccagggcca ggacgaaagt 960
ctggacagca agaaatccac cagccatgac ctggctcggc agatggagggt gtag 1014

```

```

<210> 29
<211> 5122
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4250893CB1

```

```

<400> 29
gagccagcag cccggggctc cactctgggt tctgaaagcc cattcctgct tctggggctc 60
ctcccacccc acctcttctc agccttgcag ctcaaggggt gatctcagga gtccaggacc 120
caggagaggg aagaatctga ggaacacaga acagtgagcg ttgcccacac cccatctccc 180
gtcaccacat ctcccctctg taacaccctc cctgcctggc cctggacccc atcccaggac 240
ctcccataca gctgacttct tccagtgtct tgcaggcccc tctgggctcc tccctcccct 300
ggcttttctc accactcccc ctctatcggc gtctatctgt aggtgcctct ggattataa 360
aactgggttc cgaatgctga ataagagagc gtaagagcca aggcaaagga cagcactggt 420
ctctgcctgc ctgataacct caccacctgg gaacatcccc cagacacct cttactccg 480
ggacagagat ggctggcgga gccctggggc gectggcctg ttacttggag ttctgaaga 540
aggaggagct gaaggagtcc cagcttctgc tgcccaataa agcgcactcc aggagctctt 600
cgggtgagac acccgctcag ccagagaaga cagttggcat ggaggtggcc tctgacctgg 660
tggctcagta tggggagcag cgggcccggg acctagccct ccatacctgg gagcagatgg 720
ggctgaggtc actgtgcgcc caagcccagg aaggggcagg ccactctccc tcatctccc 780
acagcccagg tgaaccccac ctggggctct ccagccaacc cacctccacc gcagtgctaa 840
tgcctgggat ccatgaattg ccggcggggg gcacccaggg ctacagagaga agggttttga 900
gacagctgcc tgacacatct ggaogccgct ggagagaaat ctctgcctca cacgtctacc 960
aagctcttcc aagctcccga gaccatgagt ctccaagcca ggagtcacc aacgccccca 1020
catccacagc agtgcctggg agctggggat ccccactca gccagccta gcacccagag 1080
agcaggaggg tccctgggacc caatggcctc tggatgaaac gtcaggaatt tactacacag 1140
aaatcagaga aagagagaga gagaaatcag agaaaaggcag gcccctatgg gcagcgggtg 1200
taggaacgcc cccacagcg cacaccagcc tacagcccca ccaccacca tgggagcctt 1260
ctgtgagaga gagcctctgt tccacatggc cctggaaaaa tgaggatttt aacaaaaaat 1320

```

tcacacagct	gctaacttcta	caaagacctc	accccagaag	ccaagatccc	ctgggtcaaga	1380
gaagctggcc	tgattatgtg	gaggagaatc	gaggacattt	aattgagatc	agagacttat	1440
ttggcccagg	cctggatacc	caagaacctc	gcatagtcac	actgcagggg	gctgctggaa	1500
ttgggaagct	aacactggcc	aggcaggtga	aggaagcctg	ggggagaggc	cagctgtatg	1560
gggaacgctt	ccagcatgtc	ttctacttca	gctgcagaga	gctggcccag	tccaaggtgg	1620
tgagtctcgc	tgagctcacc	ggaaaagatg	ggacagccac	tccggctccc	attagacaga	1680
tcctgtctag	gccagagcgg	ctgctcttca	tcctcgatgg	tgtagatgag	ccaggatggg	1740
tctttgcagga	gccgagttct	gagctctgtc	tgcaactggag	ccagccacag	ccggcggatg	1800
cactgctggg	cagtttgcctg	gggaaaacta	tacttcccga	ggcatccttc	ctgatcacgg	1860
ctcggaccac	agctctgcag	aaacctcattc	cttcttttga	gcaggcacgt	tgggtagagg	1920
tcctgggggt	ctctgagtec	agcaggaagg	aatatttcta	cagataattc	acagatgaaa	1980
ggcaagcaat	tagagccttt	aggttgggtca	aatcaaacaa	agagctctgg	gcctgtgttc	2040
ttgtgccctg	ggtgtctctg	ctggcctgca	cttgcctgat	gcagcagatg	aagcggaagg	2100
aaaaactcac	actgaacttc	aagaccacca	caacctctg	tctacattac	cttggcccag	2160
ctctccaagc	tcagccattg	ggaccccagc	tcagagacct	ctgctctctg	gctgctgagg	2220
gcatctggca	aaaaaagacc	cttttcagtc	cagatgacct	caggaagcat	gggttagatg	2280
gggccaactc	ctccaccttc	ttgaagatgg	gtattcttca	agagcaccoc	atccctctga	2340
gctacagctt	cattcacctc	tgtttccaag	agttctttgc	agcaatgtcc	tatgtctctg	2400
aggatgagaa	ggggagaggt	aaacattcta	attgcatcat	agattttgaa	aagacgctag	2460
aagcatatgg	aatacatggc	ctgtttgggg	catcaaccac	acgtttccta	ttgggcccgt	2520
taagtgatga	gggggagaga	gagatggaga	acatctttca	ctgcgccgtg	tctcagggga	2580
ggaaacctgat	gcagtgggtc	ccgtccctgc	agctgctgct	gcagccacac	tctctggagt	2640
ccctccactg	cttgatagag	actcggaaca	aaacgttcc	gacacaagtg	atggcccatt	2700
tcgaagaaat	gggcatgtgt	gtagaaacag	acatggagct	cttagtgtgc	actttctgca	2760
ttaaatcag	ccgccacgtg	aagaagcttc	agctgattga	gggcaggcag	cacagatcaa	2820
catggagccc	caccatggtc	gtcctgttca	ggtgggtccc	agtcacagat	gcctattggc	2880
agattctctt	ctccgtctct	aaggtcacca	gaaacctgaa	ggagctggac	ctaagtggaa	2940
actcgtctgag	ccactctgca	gtgaagagtc	tttghtaagac	cctgagacgc	cctcgtctgc	3000
tcctggagac	cctgcgggtg	gctggctgtg	gcctcacagc	tgaggactgc	aaggaccttg	3060
cctttgggct	gagagccaac	cagaccctga	ccgagctgga	cctgagcttc	aatgtctca	3120
cggatgctgg	agccaaacac	ctttgccaga	gactgagaca	gccgagctgc	aagtcacagc	3180
gactgcagct	ggtcagctgt	ggcctcacgt	ctgactgctg	ccaggacctg	gcctctgtgc	3240
ttagtgcagc	ccccagcctg	aaggagctag	acctgcagca	gaacaacctg	gatgacgttg	3300
gctgtcagct	gctctgtgag	gggctcaggc	atcctgcctg	caaactcata	cgctggggc	3360
tggaaccagac	aactctgagt	gatgagatga	ggcaggaact	gagggccctg	gagcaggaga	3420
aaactcagct	gctcactctc	agcagacgga	aaaccaagtgt	gatgacctct	actgagggcc	3480
tggatacggg	agagatgagt	aatagcacat	cctcaactcaa	gcggcagaga	ctcggatcag	3540
agagggcggc	ttcccatggt	gctcaggcta	atctcaaact	cctggacgtg	agcaagatct	3600
tcccatttgc	tgagattgca	gaggaaagct	ccccagaggt	agtaccgggt	gaactcttgt	3660
gcgtgccttc	tcctgcctct	caaggggacc	tgcatacgaa	gcctttgggg	actgacgatg	3720
acttctgggg	ccccacgggg	cctgtggcta	ctgaggtagt	tgacaaagaa	aagaacttgt	3780
accgagttca	cttccctgta	gctggctcct	accgctggcc	caacacgggt	ctctgctttg	3840
tgatgagaga	agcgggtgacc	gttgagattg	aatctctgtg	gtgggaccag	ttcctgggtg	3900
agatcaaac	acagcacagc	tggatggtgg	cagggcctct	gctggacatc	aaggctgagc	3960
ctggagctgt	ggaagctgtg	cacctccctc	actttgtggc	tctccaaggg	ggccatgtgg	4020
ccacatccct	gttccaaatg	gcccacttta	aagaggaggg	gatgctcctg	gagaagccag	4080
ccaggggtga	gctgcatac	atagttctgg	aaaaccccag	cttctcccc	ttgggagtcc	4140
tcctgaaaat	gatccataat	gcctgcgct	tcatctccgt	caactctgtg	gtgttgcctt	4200
accaccggt	ccatcctgag	gaagtcaact	tccacctcta	cctgatccca	agtgactgct	4260
ccattcggaa	ggccatagat	gatctagaaa	tgaaattcca	gtttgtgcga	atccacaagc	4320
cacccccgct	gaccccactt	tatatgggct	gtcgttacac	tgtgtctggg	tctggttcag	4380
ggatgcttga	aatactcccc	aaggaactgg	agctctgcta	tccaagccct	ggagaagacc	4440
agctgtcttc	ggagtcctac	gttggccact	tgggatcagg	gatcaggctg	caagtgaaag	4500
acaagaaaga	tgagactctg	gttggggagg	ccttggtgaa	accaggagat	ctcatgcctg	4560
caactactct	gatccctoca	gcccgcatag	ccgtaccttc	acctctggat	gccccgcagt	4620
tgctgcactt	tgtggaccag	tatcgagagc	agctgatagc	ccgagtgaca	tcggtggagg	4680
ttgtcttggg	caaaactgcat	ggacaggtgc	tgagccagga	gcagtaagag	agggctgtgg	4740
ctgagaacac	gagggcccagc	cagatgcgga	agctgttcag	cttgagccag	tcctggggacc	4800
ggaagtgcaa	agatggactc	taccaagccc	tgaaggagac	ccatcctcac	ctcattatgg	4860
aactctggga	gaagggcagc	aaaaagggac	tcctgccact	cagcagctga	agtatcaaca	4920
ccagcccttg	acccttgagt	cctggctttg	gctgacctt	ctttgggtct	cagtttcttt	4980
ctctgaaaac	aagttgccat	ctggtttgcc	ttccagcact	aaagtaatgg	aacttatgat	5040
gatgccttgc	tgggcattat	gtgtccagcc	agggatgcac	agggggccca	gtcaggtggg	5100
ctacagcate	tcagggatgt	cc				5122

<210> 30  
 <211> 1241

<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 6726656CB1

```

<400> 30
atztatggag gcaaccaaca aattacacag caatgaattc tggactgtag tcccacagcc 60
ttgagcctag atactagctg tgtcaactaa actctgtgtg accaggaagc ttgagtgcc 120
aagggtttga taaatgtgga aaataaccgc tgttcgaata tcctgttggc ctgctgtgat 180
gtgaggtgtg gaagaaacac gggagcagcc ttccctcagga cacctcttgt ttatctctct 240
agctctgaaa tcacatgaag ctgtggatgg agagtcaact gatagtccca gaaaccctgc 300
ccagcccaag gatgatgagt aaccagacgt tggtaaccga gttcatctcg cagggctttt 360
cggagcacc cagaataccgg gtgttcttat tcagctgttt cctcttctc tactctgggg 420
ccctcacagg taatgtctc atcaccttgg ccatcacggt caaccctggg ctccacgctc 480
ctatgtactt ttcttactc aacttggcta ctatggacat tatctgcacc tcttccatca 540
tgcccaggc cctggccagt ctggtgtcgg aagagagctc catctctac gggggctgca 600
tggcccagct ctatctctc acgtgggctg catctctaga gctgctgctc ctacagggtca 660
tggcctatga ccgggtacgca gccatctgcc acccgcctgca ttacagcagc atgatgagca 720
aggtgttctg cagcgggctg gccacagccg tgtggctgct ctgcgctgct aacacggcca 780
tccacacggg gctgatgctg cgttgggatt tctgtggccc caatgtcatt atccatttct 840
tctgcgaggt cctctctctg ctgcttctct cctgcagctc cacctacgct aacgggtgca 900
tgattgtctc ggccggtgct ttctacggca tagtgaactt cctgatgacc atcgcgtctc 960
atggttcat cgtctccagc atcctgaagg tgaagactgc ctgggggagg cagaaagcct 1020
tctccacctg ctcttcccac ctaccctggt tgtgcattga ttacaccgct gtcttctacg 1080
cctacataag ccgggtctct ggctacagc caggaagag caagttggct ggctgctgt 1140
acactgtgct gagtctctacc ctcaaccccc tcatctatac tttgagaaac aaggaggtca 1200
aagcagccct caggaagctt ttccctttct tcagaaatta a 1241

```

<210> 31  
<211> 1155  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472062CB1

```

<400> 31
atgaaatgtc ttctggcaga ttcaaattca aataaaaaga ttgtgcataa acacatctgc 60
agcctacagt cagcccccaa gactacgaac ctccaaccct caatatctga tatctgcta 120
aggtgtgaga gtaatgacag gaagaatgtg tctaagataa aaggggattg ttccaacaca 180
agagtatctt gtgattctaa aataacatcc atggagaata atacagaggt gagtgaattc 240
atctgtcttg gtctaaccaa tgcccagaa ctacagggtc cctctttat catgtttacc 300
ctcatctacc tcatcactct gactgggaac ctggggatga tcatattaat cctgctggac 360
tctcatctcc aacttccat gtactttttt ctcagtaacc tgtctcttgc aggcattggg 420
tactctcag ctgtcactcc aaaggtttta actgggttgc ttatagaaga caaagccatc 480
tcctacagtg cctgtgctgc tcagatgttc ttttgtgcag tctttgccac tgtggaaaat 540
tacctcttgt cctcaatggc ctatgaccgc tacgcagcag tgtgtaacc cctacattat 600
accaccacca tgacaacacg tgtgtgtgct tgtctggcta taggctgtta tgtcattggg 660
tttctgaaat cttctatcca aattggagat acatttgcgc tctctttctg catgtccaat 720
gtgatcctc actttttctg tgacaaacca gcagtcatta ctctgacctg ctctgagaaa 780
cacattagtg agttgattct tgtctttata tcaagtttta atgtctttt tgcacttctt 840
gttaccttga ttctctatct gttcatattg atcaccattc ttaagaggca cacaggtaag 900
ggataaccaga agcctttatc tacctgtggg tctcacctca ttgccatttt cttattttat 960
ataactgtca tcatcatgta catacgacca agttccagtc attccatgga cacagacaaa 1020
attgcatctg tgttctacac tatgatcctc cccatgctca gtcttatagt ctataccctg 1080
aggaacaaa acgtgaagaa tgcattcatg aaggttgttg agaaggcaaa atattctcta 1140
gattcagctt tttaa 1155

```

<210> 32  
<211> 1260  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472067CB1

```

<400> 32
atgctggcag ctgcctttgc agactctaac tccagcagca tgaatgtgtc ctttgctcac 60
ctccactttg cgggagggtg cctgccctct gattcccagg actggagaac catcatcccg 120
gctctcttgg tggctgtctg cctgggtggc ttcgtgggaa acctgtgtgt gattggcacc 180
ctccttcaca atgcttggaa aggaaagcca tccatgatcc actccctgat tctgaatctc 240
agcctggctg atctctccct cctgctgttt tctgcaccta tccgagctac ggcgtactcc 300
aaaagtgttt gggatctagg ctggtttgtc tgcaagtccct ctgactgggt tatccacaca 360
tgcatggcag ccaagagcct gacaatcgtt gtggtggcca aagtatgctt catgtatgca 420
agtgaccag ccaagcaagt gagtatccac aactacacca tctggtcagt gctgggtggc 480
atctggactg tggctagcct gttacccttg ccggaatggt tcttttagcac catcaggcat 540
catgaagggt tggaaatgtg cctcgtggat gtaccagctg tggctgaaga gtttatgtcg 600
atgtttggta agctctaccc actcctggca tttggccttc cattattttt tggcagcttt 660
tatttctgga gagcttatga ccaatgtaaa aaacagggaa ctaagactca aaatcttaga 720
aaccagatac gctcaaagca atgcacagtg atgctgtgta gcattgccat catctctgct 780
ctcttgtggc tccccgaatg ggtagcttgg ctgtgggtat ggcactctgaa ggcctgcagg 840
ccggccccac cacaaggttt catagccctg tctcaagtct tgatgttttc catctcttca 900
gcaaactctc tcatttttct tgtgatgtcg gaagagtcca gggaggcttt gaaaggtgta 960
tggaaatgga tgataccaa aaaacctcca actgtctcag agtctcagga aacaccagct 1020
ggcaactcag aggggtctcc tgacaagggt ccatctccag aatccccagc atccatacca 1080
gaaaaagaga aaccagctc tccctctctt ggcaaaagga aaactgagaa ggcagagatt 1140
cccctcttcc ctgacgtaga gcagttttgg catgagaggg acacagtcct tctgtacac 1200
gacaatgacc ctatcccttg ggaacatgaa gatcaagaga caggggaagg tgttaaatag 1260

```

<210> 33  
<211> 945  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472072CB1

```

<400> 33
atgggggatg tgaatcagtc ggtggcctca gacttcattc tgggtggcct cttcagtcac 60
tcaggatcac gccagctcct cttctccctg gtggctgtca tgtttgtcat aggccttctg 120
ggcaacaccg ttcttctctt cttgatccgt gtggactccc ggctccatac acccatgtac 180
ttcttgcctc gccagctctc cctgtttgac attggctgtc ccatggtcac catcccaag 240
atggcatcag actttctgct ggggagaagg gccacctcct atggaggtgg tgcagctcaa 300
atatcttccc tcacactgat cgggtgtggc gagggcgtcc tgttggctct catgtcttat 360
gaccgttatg ttgctgtgtg ccagcccctg cagtatcctg tacttatgag acgccaggta 420
tgtctgtctg tgatgggctc ctctgggtg gtagggtgtc tcaacgcctc catccagacc 480
tccatcaccg tgcattttcc ctactgtgct tcccgtattg tggatcactt cttctgtgag 540
gtgccagccc tactgaagct ctctgtgca gatacctgtg cctacgagat ggcctgttcc 600
acctcagggg tgcctgacct aatgctccct ctttccctca tggccacctc ctacggccac 660
gtgttgcagg ctgttctaag catgcctca gagggagcca gacacaaggc tgtcaccacc 720
tgctctctgc acatcacggg agtggggctc ttttatgggt ccgccgtgtt catgtacatg 780
gtgccttggc cctaccacag tccacagcag gataacgtgg tttccctctt ctatagcctt 840
gtcaccctca cactcaacc ccttatctac agtctgagga atccggaggt gtggatggct 900
ttggtcaaaag tgcttagcag agctggactc aggcaaatgt gctga 945

```

<210> 34  
<211> 765  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472074CB1

```

<400> 34
atggcctccc ggtatgtggc agtgggaatg atcttatcac agaccgtggt gggagtctctg 60
gggagcttct ctgttctctc ccattatctc tccttttact gcactgggtg caggttaagg 120
tccacagatt tgattgtaa gcacctgatt gtagccaact tcttagctct ccgctgtaa 180
ggagtcctcc agacaatggc agcttttggg gttagatatt ttctcaatgc tcttgggtgc 240

```

```

aaacttgttt tctatctcca tagagtgggc aggggagtggt ccattggcac cacctgcctc 300
ttgagtgtct tccaggtgat cacggtcagc tccaggaaat ccaggtgggc aaaacttaaa 360
gagaaagccc ccaagcatgt tggcttttct gttctcctgt gctggatcgt gtgcatggtg 420
gtaaacatca tctttcccat gtatgtgact ggcaaatgga actacacaaa catcacagtg 480
aacgaggatt tgggatactg ttctggggga ggcaacaaca aaatgcaca gacactgcgt 540
gcaatgttgt tatcattccc tgatgtgttg tgtctggggc tcatgctctg ggtcagcagc 600
tccatggttt gcacctctga caggcacaag cagcgggtcc agcacattga taggagcgat 660
ctctcccca gagcctccc agagaacaga gctacgcaga gcacctcat cctggtgagc 720
acctttgtgt cttcttaaac tctctcctgc cttttccaag tttga 765

```

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 1089

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Incyte ID No: 7472077CB1

&lt;400&gt; 35

```

atgtacaagg actgcatcga gtccactgga gactattttc ttctctgtga cgccgagggg 60
ccatggggca tcattctgga gtccctggcc atacttggca tctgtggcac aattctgcta 120
ctcttagcat ttctcttccct catgcgaaag atccaagact gcagccagtg gaatgtcctc 180
cccaccagc tctcttccct cctgagtgct ctggggctct tccgactcgc ttttgccctc 240
atcatcgagc tcaatcaaca aactgcccc gtacgctact ttctctttgg ggttctcttt 300
gctctctgtt tctcatgcct cttagctcat gcctccaatc tagtgaagct ggttcggggg 360
tgtgtctcct tctcctggac gacaattctg tgcattgcta ttggttgcag tctgttgcaa 420
atcattattg ccaactgagta tgtgactctc atcatgacca gaggtatgat gtttgtgaat 480
atgacacctt gccagctcaa tgtggacttt gttgtactcc tggctatgt cctcttctg 540
atggccctca cattctctgt ctccaagccc acctctctgt gcccggtgta gaactggaag 600
cagcatggaa ggctcatctt tatcaactgt ctctctcca tcatcatctg ggtgggtggt 660
atctccatgc tctctgagag caaccocgag ttccagcgac agccccagtg ggacgacccc 720
gtcgtctgca ttgctctggt caccaacgca tgggttttcc tgcctgtgta catcgtccct 780
gagctctgca ttctctacag atcgtgtaga caggagtgcc ctttacaagg caatgcctgc 840
cccgtcacag cctaccaaca cagcttccaa gtggagaacc aggagctctc cagagataaa 900
tggaggtctt tactcaactc ggacttccca tcacacagtg gtgcagcccg agacagtgat 960
ggagctgagg aggatgtagc attaaactca tatggtactc ccattcagcc gcagactggt 1020
gatccacac aagagtgttt catcccacag gctaaactaa gccccagca agatgcagga 1080
ggagtataa 1089

```

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 1334

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;223&gt; Incyte ID No: 7472082CB1

&lt;400&gt; 36

```

atgtgtaaat gcttcagaag tggcaatagc actccagtc tgtgtcaccg aaactcagaa 60
gcatggcagc ccaggaagcc cccaagaaca cagcaaactg acatgggtta caccaattta 120
aattccaaga aagagtgcac gtacattaag gaaaatttca aaaagactgt tgacaagatc 180
gtggaccctg gaaaccattc ctcaagtact gaggccattc tggctgggct ctcagaacag 240
ccagagctcc agctgcgctt cttctcctg ttcttaggaa tctgtgtggt cacagtgggt 300
ggcaacttgg gcagatcac actgattggg ctcagttctc acctgcacac acctatgta 360
tattctctca gcagtctgtc cttcattgac ttctgccatt ccactgtcat taccctaaag 420
atgctggtga actttgcgac agagaagaac atcatctcct acctgaatg catggctcag 480
ctctatttat tcagtatttt tgetattgca gagtgtcaca tgttggctgc aatggcgtat 540
gactgttatg ttgccatctg cagccccttg ctgtacaatg tcatcatgtc ctatcaccac 600
tgcttctggc tcacagtggg agtttacatt ttaggcatec ttggatctac aattcattac 660
agttttatgt tgagactctt tttgtgcaag actaatgtga ttaaccatta tttttgtgat 720
cttttccctc tcttggggct ctctgctcc agcacctaca tcaatgaatt actggtctg 780
gtcttgagtg catttaacat cctgatgcct gccttaacca tcttgcctc ttacatcttt 840
atcattgcca gcacctccg cattcactcc actgagggca ggtccaaagc cttcagcact 900
tgcagctccc acatcttggc tgttgcgttt ttctttggat ctgcagcatt catgtacctg 960
cagccatcat ctgtcagctc catggaccag aggaaagtgt cgtctgtgtt ttatactact 1020

```

```

attgtgcccc tgctgaaccc cctgatctac agcctgagga ataaagatgt caaacttgcc 1080
gtgaagaaaa ttctgcatca gacagcatgt taatgaatag aatcaatgtt atgttggtac 1140
atcaagatag gtcttttggt ttatttagata tctaacttat tggatttatt gttgagattt 1200
atgaaaattt agtgatgctc ttttatgtaa caccctccca aatatctctc cgggtctgct 1260
tccatcgaac ttatattcca atgagcatat gtaaagaaat acaaagaata aatcaaaaag 1320
acttttgagg tttt

```

<210> 37  
<211> 960  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472128CB1

```

<400> 37
atgacacctg gagaactage ccttgccagt ggcaaccaca cccagtcac caagttcatc 60
ttgcagggat tctccaatta tccagacctc caggagcttc tcttcggagc catctgctc 120
atctatgcca taacagtggg gggcaacttg ggaatgatgg cactcatctt cacagactcc 180
catctccaaa gcccaatgta tttcttcctc aatgtcctct cgtttcttga tatttggtac 240
tctttctgtg tcacacctaa gctcttggtc aacttctctg tctctgacaa gtccatctct 300
tttgagggct gtgtggtcca gctcgccttc tttgtagtgc atgtgacagc tgagagcttc 360
ctgctggcct ccattggccta tgaccgcttc ctagccatct gtcaaccctc ccattatggt 420
tctatcctga ccagggggac ctgtctccag ctggtagctg tgtcctatgc atttggtgga 480
gccaaactcc ctatccagac tggaaatgtc tttgcctgct ctttctgtgg gcccaaccag 540
cctaacaact actactgtga cataaccacc cttctccacc tggcttctgc caacacagcc 600
acagcaagag tggctcctca tgtctttctc gctctgggta cccttctgcc tgcctgagtc 660
attctcaact cctactgctt ggtcttgggt gccattggga ggatgcgctc agtagcaggg 720
agggagaagg acctctccac ttgtgcctcc cactttctgg ccattgccaat tttctatggc 780
actgtgggtt tcaacctatgt tcagccccat ggatctacta acaataccaa tggccaagta 840
gtgtccgtct tctacaccat cataattccc atgctcaatc ccttcatcta tagcctccgc 900
aacaaggagg tgaagggcgc tctgcagagg aagcttcagg tcaacatctt tcccggctga 960

```

<210> 38  
<211> 939  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472134CB1

```

<400> 38
atggacacag ggaactggag ccaggtagca gaattcatca tcttgggctt ccccatctc 60
caggtgtgct agatttatct cttctctctg ttgcttctca tttacctcat gactgtggtg 120
ggaaacctgc tgatattcct ggtggtctgc ctggactccc ggcttcacac acccatgtac 180
cactttgtca gcattctctc cttctcagag cttggctata cagctgccac catccctaag 240
atgctggcaa acttgcctag tgagaaaaag accatttcat tctctgggtg tctcctgcag 300
atctatttct tcaactcctt tggagcgact gactgctatc tctgacagc tatggcctac 360
gataggtatt tagccatctg ccggccccct cactacccaa cctcatgac cccaacactt 420
tgtgcagaga ttgccattgg ctgttgggtg ggaggcttgg ctgggccagt agttgaaatt 480
tctttgattt caogcctccc attctgtggt cccaatcgca ttcagcacgt cttttgtgac 540
ttcctcctg tgctgagttt ggcttgcaat galactctca taaatgtcct agtagatttt 600
gttataaatt cctgcaagat cctagcccacc ttcctgctga tctctgctc ctatgtgcag 660
atcatctgca cagtgcctag aattcccctca gctgcoggca agaggaaggc catctccagc 720
tgtgcctccc acttcaactgt ggtctctatc ttctatggga gcaccccttc catgtatggt 780
cagctgaaga agagctactc actggactat gaccaggccc tggcagtggt ctactcagtg 840
ctcacaccct tctcaaccct cttcatctac agcttgcgca acaaggagat caaggaggct 900
gtgaggaggc agctaaagag aattgggata ttggcatga 939

```

<210> 39  
<211> 968  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472136CB1

```

<400> 39
ggatgaacca gactttgaat agcagtgagg ccgtaggagtc agccctaaac tattccagag 60
ggagcacagt gcacacggcc tacctgggtgc tgagctccct ggccatgttc aactgcctgt 120
gcgggatggc aggcaacagc atggatgatc ggctgctggg ctttcgaatg cacaggaacc 180
ccttctgcat ctatatcttc aacctggcgg cagccgacct cctcttcttc ttcagcatgg 240
cttccacgct cagcctggaa acccagcccc tggtaatac cactgacaag gttccagagc 300
tgatgaagag actgatgtac tttgcctaca cagtagggcct gagcctgctg acggccatca 360
gcaccacagc ctgtctctct gtcctcttcc ctatctgggt caagtgtcac cggccaggc 420
acctgtcagc ctgggtgtgt ggctgtctgt ggacactctg tctcctgatg aacgggttga 480
cctctctctt ctgcagcaag ttcttgaat tcaatgaaga tgggtgcttc aggtgggaca 540
tgggtccaggc cgcctctatc atgggggtct taacccagat gatgactctg tccagcctga 600
ccctctttgt ctgggtgcgg aggagctccc agcagtaggg gggcagccc acacggctgt 660
tcgtgggtgt cctggcctct gtcctgggtg tctctatctg tccctgctc ctgagcatct 720
actggtttgt gctctactgg ttgagcctgc cgcccagat gcaggctctg tgettccagc 780
tgtcacgccc ctctctctcc gtaagcagca gcgccaaacc cgtcatctac ttctgggtgg 840
gcagccggag gagccacagg ctgcccacca ggtcctggg gactgtgctc caacaggcgc 900
ttcgcgagga gcccagcctg gaaggtgggg agacgcccac cgtgggcacc aatgagatgg 960
gggcttga

```

<210> 40  
<211> 1000  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472142CB1

```

<400> 40
attaaatgaa ggaatagta ctggaagaaa tatagatgaa agaaagaaaa tgcaaggaga 60
aaacttcacc atttggagca ttttttctt ggagggattt tccagttacc cagggttaga 120
agtggttctc ttcgtcttca gccttgtaat gtatctgaca acgctcttgg gcaacagcac 180
tcttattttg atcactatcc tagattcacg ccttaaaacc ccatgtact tattccttgg 240
aaatctctct tccatggata ttgttacac atctgctctc gttctactt tgctggtaga 300
cttgcctgca tcccagaaaa ccattatctt ttctgggtgt gctgtacaga tgtatctgtc 360
ccttgccatg ggctccacag agtgtgtgct cctggccgtg atggcatatg accgttatgt 420
ggccatttgt aaccgcctga gatactccat catcatgaac aggtgctctt gtgcacggat 480
ggccaacggtc tctgggttga cgggttgcct gaccgctctg ctggaaacca gttttgcct 540
gcagatcccc ctctgtggga atctcatcga tcaactcacg tgtgaaatc tggcgggtgt 600
aaagttagct tgcacaagtt cactgctcat gaacaccatc atgctgggtg tcagcattct 660
cctcttgcca attccaatgc tcttagtttg catctcttac atcttcatcc ttccactat 720
tctgagaatc acctcagcag agggaagaaa caaggctttt tctacctgtg gtgcccattt 780
gactgtgggt attttgtatt atggggctgc cctctctatg tactaaagc cttcttcctc 840
aaatgcacaa aaaatagaca aaatcatctc gttgctttac ggagtgtcta cccctatggt 900
gaaccccata atttacagtt taagaacaaa ggaagtcaaa gatgctatga agaaattgct 960
gggcaaaaata acattgcatc aaacacacga acatctctga 1000

```

<210> 41  
<211> 1008  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 7472171CB1

```

<400> 41
ctgtggacca tctcttcaga actctgcagc atggagccgc tcaacagAAC agagggtgtcc 60
gagttcttct tgaaggatt ttctggctac ccagccctgg agcatctgct cttccctctg 120
tgctcagcca tgtacctggg gacctctctg ggaacacag ccatcatggc ggtgagcgtg 180
ctagatatcc acctgcacac cccggtgtac ttcttcttgg gcaacctctc taccctggac 240
atctgctaca cgcaccctt tgtgctctg atgctggtcc acctcctgtc atcccggag 300
accatctctt ttgctgtctg tgcattccag atgtgtctga gctgtccac gggctccagc 360
gagtgcctgc tactggccat cacggcctat gaccgctacc tggccatctg ccagccactc 420

```

```

aggTaccagc tgetcatgag ccacoggetc tgcgtgctgc tgatgggagc tgcoTgggtc 480
ctctgcctcc tcaagtcggt gactgagatg gtcacttcca tgaggctgcc cttctgtggc 540
caccacgtgg tcagtcactt cacttgcaag atcctggcag tgctgaagct gccatgcggc 600
aacacgtcgg tcagcgaaga cttcctgctg gcgggctcca tctgctgct gccgtgacc 660
ctggcattca totgcctgtc ctacttgctc atcctggcca ccatectgag ggtgccctcg 720
gccgcaggt gctgcaaagc cttctccacc tgcttggcac acctggctgt agtgcctgt 780
ttctacggca ccacatctt catgtacttg aagccaaga gtaaggaagc ccacatctc 840
gatgaggtct tcacagtcct ctatgccatg gtcacgacca tgctgaacc caccatctac 900
agcctgagga acaaggaggt gaaggaggcc gccaggaagg tgtggggcag gagtggggcc 960
tccagtgagg gagggcgggg ctctgtacag acgcaggtct caggttag 1008

```

<210> 42

<211> 972

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> Incyte ID No: 7472172CB1

<400> 42

```

ggaaaccctg cccaccatat agtagttgtc atgggaaact ggagcaactg gactgaaatc 60
accctaattg ccttcccagc tctcctggag attcgaatat ctctcttctg ggttcttgtg 120
gtaacttaca cattaacagc aacaggaaac atcaccatca tctccctgat atggattgat 180
cctgcctgca aaactccaat gtacttcttc ctacagtaatt tgcctttctt ggatatctta 240
tacaccactg tcattaccoc aaagttgttg gcctgcctcc tagggagaaga gaaaaccata 300
tcttttgctg gttgcatgat ccaaacatat ttctacttct ttctggggac ggtggagttt 360
atcctcttgg cgggtgatgtc ctttgaccgc tacatggcta tctgcgacc actgcactac 420
acggtcacatc tgaacagcag gccctgcctt ctgctggttc tgggatgctg ggtgggagcc 480
ttcctgtctg tgttgtttcc aaccattgta gtgacaaggc taacttactg taggaaagaa 540
attaatcatt tcttctgtga cattgcccc cttcttcagg tggcctgtat aaatactcac 600
ctcattgaga agataaaact tctcctctct gcccttgtca tctgagctc cctggcattc 660
actactgggt cctacgtgta cataatctt accatcctgc gtatcccc cccccagggc 720
cgtcagaaaag ctttttctac ctgtgcttct cacatcactg ttgtctccat tgcccacggg 780
agcaacatct ttgtgtatgt gagaccctc cagaactcct cactggatta tgacaagggt 840
gccgtgtcc tcacacaggt ggtgaccctt ctctgaacc cttttateta cagcttgagg 900
aatgagaagg tacaggaagt gttgagagag acagtgaaca gaatcatgac cttgatacaa 960
aggaaaactt ga

```

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Internet \ Application No PCT/US 01/03455
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C07K16/28 C12N5/10 C12Q1/68 A61K38/17 A01K67/027 G01N33/53		
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 C07K C12N C12Q A61K A01K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 23809 A (MERCK CO. INC.) 8 August 1996 (1996-08-08) SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:12 page 14, line 1 - line 14; figures 5,6 page 15, line 15 -page 16, line 3 ---	1-19, 22-28
X	DATABASE EMBL [Online] Accession no. AC010111. 14 September 1999 (1999-09-14) MUNZY D.M. ET AL.: "Drosophila melanogaster clone RPC198-9B18, *** SEQUENCING IN PROGRESS ***, " XP002175188 --- -/--	3
<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		"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 17 August 2001		Date of mailing of the international search report 16. 11. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schönwasser, D

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/03455
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE SWALL [Online] Accession no. Q9VNM1, 1 May 2000 (2000-05-01) ADAMS M.D. ET AL.: "The genome sequence of Drosophila melanogaster; CG1147 PROTEIN" XP002175189 ---	1
E	WO 01 31005 A (PHARMACIA & UPJOHN CO) 3 May 2001 (2001-05-03)  SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:6 ---	1,3, 6-10, 12-16, 18,19, 22-27
A	DATABASE SWALL [Online] Accession no. 097505, 1 May 1999 (1999-05-01) ITO Y. ET AL.: "Sus scrofa NPY Y4 gene for neuropeptide Y receptor type 4, complete cds; NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 4 (NEUROPEPTIDE Y-FAMILY RECEPTOR Y4)" XP002175190 -----	1-19, 22-28

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l application No.  
PCT/US 01/03455**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 18 and 24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: 20,21 not searched;23,24 searched incompletely  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-19,22-28 (all partially)

**Remark on Protest**

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

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

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

Invention 1:

An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or homologues or fragments thereof; an isolated polynucleotide encoding said polypeptide; a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to said polynucleotide; a cell transformed with said recombinant polynucleotide; a transgenic organism comprising said recombinant polynucleotide; a method for producing said polypeptide; an isolated antibody which specifically binds to said polypeptide; an isolated polynucleotide comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:22 or homologues or complements thereof; methods for detecting a target polynucleotide in a sample, wherein said target polynucleotide has a sequence of above polynucleotide; a pharmaceutical composition comprising an effective amount of above polypeptide; a method for treating a disease or condition comprising administering said composition; methods for screening a compound for effectiveness as an agonist or antagonist of above polypeptide; a composition comprising an antagonist compound identified by said screening method, a method of treating a disease or condition comprising administering to a patient said composition; a method for screening for a compound that specifically binds to above polypeptide; a method of screening for a compound that modulates the activity of above polypeptide; a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein the target polynucleotide comprises above isolated polynucleotide; a method for assessing toxicity of a test compound involving at least a fragment of above polynucleotide.

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

Inventions 2-21:

Inventions no. 2-21 relate to subject-matter as defined above for "invention no. 1", with the exception, that each of the inventions refers to one of the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:21 as mentioned in claim 1 (and to one of the corresponding nucleotide sequences SEQ ID NO:23-SEQ ID NO:42), but not to the polypeptide sequences SEQ ID NO:1 (or to the corresponding polynucleotide sequence SEQ ID NO:22).

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 20,21 not searched;23,24 searched incompletely

Claims 20 and 21 refer to agonists identified by a method described in claim 19 without giving a true technical characterization of said agonists. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

Similarly, present claims 23 and 24 relate to antagonists identified by a method described in claim 19 by reference to a desirable characteristic or property, namely the property of being identifiable by a method as described in claim 22.

The claims cover all antagonists having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such antagonists. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to antibodies against the polypeptide of claim 1 as antagonists for said polypeptides (please see page 40, line 32 - page 41, line 4).

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 01/03455

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9623809	A	08-08-1996	US 5621079 A	15-04-1997
			CA 2212225 A1	08-08-1996
			EP 0809648 A1	03-12-1997
			JP 11500610 T	19-01-1999
			WO 9623809 A1	08-08-1996
			US 5939263 A	17-08-1999
			-----	
WO 0131005	A	03-05-2001	AU 1218601 A	08-05-2001
			WO 0131005 A2	03-05-2001
-----				

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	3/00	A 6 1 P	25/00	4 C 0 8 4
	9/00		29/00	4 H 0 4 5
	25/00		31/12	
	29/00		35/00	
	31/12		37/06	
	35/00	C 0 7 K	14/705	
	37/06		16/28	
C 0 7 K	14/705	C 1 2 N	1/15	
	16/28		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10		1/68	A
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
	1/68		33/53	M
G 0 1 N	33/15		33/566	
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
	33/566	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 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 , T R ) , 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 , M Z , 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 E , A G , A L , A M ,  
 A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B  
 Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K  
 , D M , D Z , 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 A , M D , M G , M K ,  
 M N , M W , M X , M Z , 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 , T Z , U A , U G , U S , U Z ,  
 V N , Y U , Z A , 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

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 FB02  
4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA01  
CA04 CA09 CA11 DA01 DA02  
DA05 DA11 EA01 EA02 EA03  
EA04 FA02 GA01 GA11 HA01  
HA03 HA11  
4B063 QA01 QA08 QA18 QQ05 QQ13  
QQ42 QQ52 QR08 QR33 QR42  
QR55 QR59 QR62 QR74 QR80  
QS05 QS25 QS34 QS36 QX02  
4B064 AG20 AG27 CA01 CA19 CA20  
CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y  
AB01 AB02 BA01 BA24 CA24  
CA25 CA44 CA46  
4C084 AA01 AA07 DC50 ZA011  
ZA661 ZB081 ZB111 ZB261  
ZB331 ZC211  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA41 CA40 DA50 DA76 EA20  
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	G蛋白偶联受体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003527107A</a>	公开(公告)日	2003-09-16
申请号	JP2001557916	申请日	2001-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	ボーグンマライアアール オウヤングジャニス ユエヘンリー		
发明人	ボーグン、マライア・アール オウ・ヤング、ジャニス ユエ、ヘンリー		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/705 C07K14/723 C12Q1/6876 C12Q2600/158		
FI分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA07 4C084/DC50 4C084/ZA011 4C084/ZA661 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZC211 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/180093 2000-02-02 US 60/182045 2000-02-11 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码GCREC的人G蛋白偶联受体 ( GCREC ) 和多核苷酸。 本发明还提供表达载体， 宿主细胞， 抗体， 激动剂和拮抗剂。 此外， 本发明提供了一种用于诊断， 治疗和预防与GCREC异常表达有关的疾病的方法。

イサトコシカケノ目	イサトコシカケノ目 SPY ID NO.	イサトコシカケノ目	イサトコシカケノ目 SPY ID NO.	イサトコシカケノ目
1470001	1	1470001001	22	1470001001
1470002	2	1470002001	23	1470002001
1470003	3	1470003001	24	1470003001
1470004	4	1470004001	25	1470004001
1470005	5	1470005001	26	1470005001
1470006	6	1470006001	27	1470006001
1470007	7	1470007001	28	1470007001
1470008	8	1470008001	29	1470008001
1470009	9	1470009001	30	1470009001
1470010	10	1470010001	31	1470010001
1470011	11	1470011001	32	1470011001
1470012	12	1470012001	33	1470012001
1470013	13	1470013001	34	1470013001
1470014	14	1470014001	35	1470014001
1470015	15	1470015001	36	1470015001
1470016	16	1470016001	37	1470016001
1470017	17	1470017001	38	1470017001
1470018	18	1470018001	39	1470018001
1470019	19	1470019001	40	1470019001
1470020	20	1470020001	41	1470020001
1470021	21	1470021001	42	1470021001