

(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 - 517292**

(P2003 - 517292A)

(43)公表日 平成15年5月27日 (2003.5.27)

(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 6 1 K 35/76	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/76		39/395	D 4 B 0 2 4
38/00			N 4 B 0 6 3
39/395		45/00	4 B 0 6 4
		48/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全117数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 509509(P2001 - 509509)

(86) (22)出願日 平成12年7月6日 (2000.7.6)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月4日 (2002.1.4)

(86)国際出願番号 PCT/US00/18509

(87)国際公開番号 W001/004305

(87)国際公開日 平成13年1月18日 (2001.1.18)

(31)優先権主張番号 60/142,678

(32)優先日 平成11年7月7日 (1999.7.7)

(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 タング、ワイ・トム

アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・サンノゼ・ランウィックコート 4230

(72)発明者 ユエ、ヘンリー

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

(74)代理人 弁理士 大島 陽一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 解毒に関与するヒトタンパク質

(57)【要約】

本発明は、ヒト解毒タンパク質 (DETX) と、DETXを同定しコードするポリヌクレオチドとを提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニスト及びアンタゴニストをも提供する。更に、本発明は、DETXの発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法も提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 以下の(a)乃至(d)を有する群から選択した実質上単離されたポリペプチド。

(a) 配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列

(b) 配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一であるようなアミノ酸配列を有する天然のアミノ酸配列

(c) 配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列を有するアミノ酸配列の生物学的活性断片

(d) 配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列を有する免疫抗原性断片

【請求項2】 配列番号1乃至2を有する群から選択した請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

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

【請求項4】 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】 配列番号3乃至4を有する群から選択した請求項4に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3に記載のポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモータ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に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項8】 請求項6に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項9】 請求項1に記載のポリペプチドを製造する方法であって、

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

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを受容する過程とからなり、

前記組換えポリヌクレオチドが、請求項1に記載の前記ポリペプチドをコード

するポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有することを特徴とする方法。

【請求項10】 請求項1に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項11】 以下の(a)乃至(e)を有する群から選択した実質上単離されたポリヌクレオチド。

(a) 配列番号3乃至4を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド配列

(b) 配列番号3乃至4を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも70%が同一であるような天然のポリヌクレオチド配列

(c) (a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(d) (b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(e) (a)~(d)のRNA等価物

【請求項12】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項13】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

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

前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。

【請求項14】 前記プローブが少なくとも60の連続したヌクレオチド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】 請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) 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過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項16】 有効量の請求項1のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを有することを特徴とする成分。

【請求項17】 前記ポリペプチドが、配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16に記載の成分。

【請求項18】 機能性DETXの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項16に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項19】 請求項1に記載のポリペプチドのアゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

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

【請求項20】 請求項19に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする成分。

【請求項21】 機能性DETXの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項20に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項22】 請求項1に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

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

【請求項23】 請求項22に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする成分。

【請求項24】 機能性DETXの過剰発現に関連する疾患又は病状の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項23に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

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

(a) 適切な条件下で請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項1に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項26】 請求項1に記載の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であって、

(a) 請求項1に記載のポリペプチドの活性が許容された条件下で、請求項1に記載のポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、

(b) 請求項1に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、

(c) 試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、

試験化合物の存在下での請求項1に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。

【請求項27】 請求項5に記載の配列を有する標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に適した条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項28】 試験化合物の毒性を算定する方法であって、

- (a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、
- (b) 請求項11に記載のポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブと、請求項11に記載のポリヌクレオチドまたはその断片のポリヌクレオチド配列を有する前記生物学的サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間に、特定のハイブリタイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記処理されたサンプルの核酸を前記プローブでハイブリタイズする過程と、
- (c) 前記ハイブリタイゼーション複合体の量を定量する過程と、
- (d) 前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、
- 前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## (技術分野)

本発明は、ヒト解毒タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列に関し、自己免疫/炎症疾患及び癌を含む細胞増殖異常の診断、治療並びに予防におけるこれらの配列の利用に関する。

**【0002】**

## (発明の背景)

解毒は、薬理的に活性で多くの場合毒性のある分子から、薬理的に活性の低い分子への代謝性転換である。解毒反応を触媒する酵素は、多くの場合、滑面小胞体(ER)のペルオキシソーム及び膜に見られる。

**【0003】**

ペルオキシソームは、生物の基質からの酸素除去を触媒し、過酸化水素( $H_2O_2$ )を生成する1若しくは数個の酵素を有し得る。酵素カタラーゼは、 $H_2O_2$ を用いて、基質から水素を除去して $H_2O_2$ を水に転換する過酸化反応により、ギ酸、ホルムアルデヒド、フェノール及びアルコールなどの別の様々な基質を酸化する。肝臓及び腎臓細胞のペルオキシソームは、そのような酸化反応により血流に入る種々の毒性分子を解毒する。

**【0004】**

ペルオキシソームにおける酸化反応のもう1つの主要な機能は、脂肪酸分子の分解である。酸化は、脂肪酸のアルキル鎖の連続短縮であり、ペルオキシソームで生じる。アルキル鎖から取り除かれた2つの炭素原子ブロックは、アセチルCoAに転換され、サイトゾルに搬出されて生合成反応で再利用される。

**【0005】**

滑面小胞体は、通常、脂質の代謝に関与する細胞、例えばコレステロールからステロイドホルモンを合成する細胞において突出している。滑面小胞体の膜には、脂質に溶解する薬物及び種々の有害代謝物質の解毒に関与する酵素が含まれている(Alberts, B. ら. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York, NY, pp. 575-580にレビューされている)。

## 【0006】

酸化ストレスは、活性酸素種（ROS）の産出増加に関与している。ROSは、ニューロンのアポトーシス及びその他の有害な効果を生じさせることが示されてきた。酸化ストレスは、気腫、ダウン症候群、白内障、成人呼吸障害、癌、ニューロンの障害、アテローム性動脈硬化症及び老化を含む様々な病態に関連していると考えられている。酸化ストレスに応じて、複数の遺伝子の発現が調節される。調節された遺伝子には、カタラーゼ、過酸化ジスムターゼ、グルタチオンレドクターゼ、NAD(P)H依存型アルキルヒドロペルオキシドレドクターゼ、oxyR、エンドヌクレアーゼIV及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼがある。これらの遺伝子は、酵素を解毒するROSをコードする。このことは、酸化ストレスの有毒及び/または毒性効果に対する防衛の1つとしてROSを除去する解毒酵素が挙げられることを示唆している（Crawford, D.R. ら (1997) Arch. Biochem. Biophys. 342(1):6-12を参照）。

## 【0007】

最も広範に研究された解毒反応は、チトクロムP450ファミリー中で酵素に触媒される解毒反応である。チトクロムP450酵素は、約40の異なるファミリーに分類されてきた。P450タンパク質は、ヘムの結合に関与するポリヌクレオチドのC末端に、保存されたシステイン残基を有するヘムタンパク質である（1999年5月13日時点での<http://www.expasy.ch/cgi-bin>におけるPROSITE: PDOC00081）。チトクロムP450酵素は、水に不溶性の薬物を、細胞から離れて尿中に排出されるようにするべく十分に水溶性にするような反応を触媒する。そうでなければ細胞膜に毒性レベルを蓄積することになる代謝物質も、細胞膜から離れて排出されるようにするべく十分水溶性にする（Alerts, B. ら (1994) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York NY, p. 579）。

## 【0008】

新たなヒト解毒タンパク質及びそれをコードするポリヌクレオチドの発見は、自己免疫/炎症疾患及び癌を含む細胞増殖異常の診断、治療並びに予防において有用である新たな組成を提供することにより、当分野における要求を満たす。

## 【0009】

(発明の概要)

本発明は、集合的には「DETX」、個別には「DETX-1」及び「DETX-2」と呼ばれるような、実質上精製されたポリペプチドである細胞内シグナル伝達分子に特徴がある。或る実施態様において本発明は、(a)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む、実質上単離されたポリペプチドを提供する。一実施態様では、配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列を含む実質上単離されたポリペプチドを提供する。

【0010】

また、本発明は(a)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドをコードするような実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは配列番号1乃至2を有する群から選択したポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドは配列番号3乃至4を有する群から選択される。

【0011】

本発明は更に、(a)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドをコードするような実質上単離されたポリヌクレオチドと機能的に結合したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、本発明

は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

【0012】

また、本発明は（a）配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む実質上単離されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、（a）組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、（b）そのように発現したポリペプチドを受容する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有する。

【0013】

本発明は更に、（a）配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、（b）配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、（c）配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または（d）配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合するような実質上単離された抗体を提供する。

【0014】

本発明は更に、（a）配列番号3乃至4を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、（b）配列番号3乃至4を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも70%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、（c）（a）に相補的なポリヌクレオチド配列、（d）（b）に相補的なポリヌクレオチド配列、または（e）（a）～（d）のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも60の連続したヌクレオチドを有する。

【0015】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは ( a ) 配列番号 3 乃至 4 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、 ( b ) 配列番号 3 乃至 4 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 70 % の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、 ( c ) ( a ) に相補的なポリヌクレオチド配列、 ( d ) ( b ) に相補的なポリヌクレオチド配列、または ( e ) ( a ) ~ ( d ) の RNA 等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。検出方法は、 ( a ) サンプル中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列からなる少なくとも 20 の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、 ( b ) ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、プローブと標的ポリヌクレオチドの間にハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを含む。

#### 【 0 0 1 6 】

本発明はまた、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは ( a ) 配列番号 3 乃至 4 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、 ( b ) 配列番号 3 乃至 4 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 70 % の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、 ( c ) ( a ) に相補的なポリヌクレオチド配列、 ( d ) ( b ) に相補的なポリヌクレオチド配列、または ( e ) ( a ) ~ ( d ) の RNA 等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。検出方法は、 ( a ) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、 ( b ) 標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む医薬品成分を提供する。有効量のポリペプチドは、 ( a ) 配列番号 1 乃至 2 を有

する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む。一実施態様では、医薬品成分は配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列を含む。更に本発明は、機能性DETXの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程を有する方法を提供する。

#### 【0018】

本発明はまた、(a)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのアゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。一実施態様では、本発明は機能性DETXの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程を含む方法を提供する。

#### 【0019】

本発明は更に、(a)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含む。

む。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む医薬品成分を提供する。別の実施態様では、機能性DETXの過剰発現に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して医薬品成分を投与する過程を含む方法を提供する。

#### 【0020】

本発明は更に、(a)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、(b)試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

#### 【0021】

本発明は更に、(a)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)配列番号1乃至2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片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。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、(b)ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、(c)試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物を標示する。

#### 【0022】

本発明は更に、標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。標的ポリヌクレオチドは、配列番号3乃至4を有する群から選択した配列を含む。スクリーニング方法は、(a)標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b)標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含む。

#### 【0023】

本発明は更に、試験化合物の毒性を評価する方法を提供する。毒性評価方法は、(a)核酸を含む生物学的サンプルを試験化合物で処理する過程と、(b)(i)配列番号3乃至4を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(ii)配列番号3乃至4を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも70%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(iii)(i)に相補的なポリヌクレオチド配列、(iv)(ii)に相補的なポリヌクレオチド配列、または(v)(i)~(iv)のRNA等価物を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて処理生物学的サンプルの核酸をハイブリダイズする過程とからなる。ハイブリダイゼーションは、生物学的サンプルにおいて前記プローブと標的ポリヌクレオチドの間に固有のハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で発生し、前記標的ポリヌクレオチドには、(i)配列番号3乃至4を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(ii)配列番号3乃至4を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも70%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(iii)(i)に相補的なポリヌクレオチド配列、(iv)(ii)に相補的なポリヌクレオチド配列、及び(v)(i)~(iv)のRNA等価物が含まれる。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記ポリヌクレオチド配列の断片と、(c)ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d)処理生物学的サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量を非処理生物学的サンプル中のハイブリダイゼーション複合体と比較する過程とを有し、処理生物学的サンプル中のハイブリダイゼーション複合体の量の差は試験化合物の毒性を示す。

#### 【0024】

(発明を実施するための形態)

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

#### 【0025】

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

#### 【0026】

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

#### 【0027】

##### 定義

「DETX」は、実質上精製されたDETXのアミノ酸配列であって、任意の種、特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及びヒトを含む哺乳動物の種から得たもので、任意の天然物、合成物、半合成物或いは組換え物を起源とするものを指す。

#### 【0028】

「アゴニスト」の語は、DETXの生物学的活性を強化または擬態する分子を指す

。アゴニストの例として、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはDETXと直接相互作用することによって、或いはDETXが関与する生物学的経路の構成エレメントに作用することによって、DETXの活性を調節する。

#### 【0029】

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

#### 【0030】

DETXをコードする「変異(altered)」核酸配列は、種々のヌクレオチドを欠失、挿入または置換する核酸配列を有し、DETXと同一またはDETXの機能的特徴を少なくとも1つ有するポリペプチドを産出する。この定義に含まれるのは、DETXをコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能或いは検出困難な多型現象と、DETXをコードするポリヌクレオチド配列のための正常な染色体遺伝子座以外の遺伝子座に占めるような、対立遺伝子変異体に対する不適切或いは不測のハイブリダイゼーションである。コードされたタンパク質も「変異」し得るものであり、サイレント変化を生ぜしめて結果的に機能的に等価なDETXとなるようなアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含み得る。計画的アミノ酸置換は、DETXの生物学的または免疫学的活性が保持される限りにおいて、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性及び/または両親媒性特性の類似性にに基づき行い得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとスレオニンがある。親水性値が近似している非荷

電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

「抗体」の語は、無損傷免疫グロブリンやその断片、例えばFa、F(ab')<sub>2</sub>及びFv断片を指すが、これらはエピトープの決定基と結合することができる。DETXポリペプチドを結合する抗体は、無損傷ポリペプチドを用いるか或いは免疫抗原として感心のある小ペプチドを含む断片を用いるかして調製することができる。動物(マウス、ラット、ウサギ等)を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、翻訳または化学合成されたRNAに由来し得るもので、好みに応じて担体タンパク質に接合することも可能である。通常用いられる担体であってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)等がある。結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

## 【0035】

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

## 【0036】

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

## 【0037】

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

## 【0038】

「相補(的)」または「相補性」の語は、塩基対形成によりアニールする2つの一本鎖分子間の関係を説明する。例として、「5'A-G-T3'」とその相補配列「3'T

-C-A5'」がある。

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

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

元の残基	保存的な置換
Ala	Gly, Set

Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

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

【0042】

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

【0043】

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

ているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化 (pegylation)、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドから少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持しているプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

#### 【0044】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成することができ、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに共有結合または非共有結合するようなレポーター分子または酵素を指す。

#### 【0045】

「断片」は、DETXまたはDETXをコードするポリヌクレオチドの固有部分であって、親配列と同一配列であるが親配列よりも長さが短い配列を指す。断片は、画定された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5~1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは少なくとも500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さとし得る。断片は、分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸（またはポリペプチドの最初の25%または50%）から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

#### 【0046】

配列番号3乃至4の断片には、固有のポリヌクレオチド配列領域が含まれる。この領域は、配列番号3乃至4を特異的に同定するものであり、例えば同一ゲノム中の配列番号3乃至4以外の配列とは異なるものである。配列番号3乃至4の断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術において、或いは関連するポリヌクレオチド配列から配列番号3乃至4を区別する類似の方法において有

用である。配列番号3乃至4の断片の正確な長さ及び断片に対応する配列番号3乃至4の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

#### 【0047】

配列番号1乃至2の断片は、配列番号3乃至4の断片によってコードされる。配列番号1乃至2の断片には、配列番号1乃至2を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、配列番号1乃至2の断片は、配列番号1乃至2を特異認識する抗体を産出するための免疫抗原性ペプチドとして有用である。配列番号1乃至2の断片及び断片に対応する配列番号1乃至2の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

#### 【0048】

「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）、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。

#### 【0049】

「相同性」の語は、配列類似性即ち2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の配列間で互換可能な配列同一性である。

#### 【0050】

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

#### 【0051】

ポリヌクレオチド配列間の一一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトパ

ラメータを用いて決定できる。このプログラムはLASERGENEソフトウェアパッケージの一部であり、一式の分子生物学分析プログラム (DNASTAR, Madison WI) である。CLUSTAL Vについては、Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153及びHiggins, D.G. ら (1992) CABIOS 8:189-191の文献に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対をなすアラインメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

#### 【0052】

或いは、通常用いられ且つ無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式が米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) から提供されている (Altschul, S.F. ら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。このアルゴリズムは、メリーランド州ベセスダにあるNCBIを含めた幾つかの情報源から入手可能であり、インターネット (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 上でも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列を対で直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn と blastp (後述) の両者に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータとして設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12 (2000年4月21日) を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: - 2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

一致率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）配列長さと比較して測定し得る。或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された配列から得られた断片（例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または200の連続したヌクレオチドの断片）の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

#### 【0053】

高度の一致率を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を生成し得ることを理解されたい。

#### 【0054】

ポリペプチド配列に適用される「一致率」または「一致%」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2以上のポリペプチド配列間で一致する残基の割合を意味する。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の酸性度及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

#### 【0055】

ポリペプチド配列間の一一致率は、MEGALIGN version 3.12e配列アラインメントプログラムに組み込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる（既に説明したのでそれを参照されたい）。CLUSTAL

Vを用いて、ポリペプチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=1、gap penalty=3、window=5、「diagonals saved」=5と設定する。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスを選択する。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

#### 【0056】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えばポリペプチド配列を2つ1組で比較をする場合、デフォルトパラメータとして設定されたblastpと共に「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)を使用してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

一致率は、完全に画定された(例えば特定の配列番号で画定された)ポリペプチド配列の長さと比較して測定し得る。一致率は、配列或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定されたポリペプチド配列から得られた断片(例えば少なくとも15、20、30、40、50、70または150の連続した残基の断片)の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、或る長さであってその長さに対して一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

#### 【0057】

「ヒト人工染色体」(HAC)は直鎖状の小染色体であり、6 kb ~ 10 MbのサイズのDNA配列を含み、安定した有糸分裂染色体の分離及び維持に必要な全てのエレメントが含まれている。

#### 【0058】

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

【0059】

「ハイブリダイゼーション」は、所定のハイブリダイゼーション条件下で塩基対を形成することによって、一本鎖ポリヌクレオチドが相補的鎖とアニーリングするプロセスを指す。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、当分野における当業者が慣例的に決定する。許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニーリング許容条件は、例えば約6×SSC、約1%（w/v）のSDS及び約100µg/mlの変性サケ精子DNAの存在下で温度68℃において成立する。

【0060】

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

【0061】

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

#### 【0062】

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

#### 【0063】

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

#### 【0064】

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

## 【0065】

「免疫抗原性断片」とは、哺乳動物等の生命体に導入されると免疫応答を誘発し得るようなDETXのポリペプチドまたはオリゴペプチド断片である。「免疫抗原性断片」の語には、本明細書中で開示したような或いは当分野で既知であるような任意の抗体産出方法において有用なDETXの任意のポリペプチドまたはオリゴペプチド断片も含まれる。

## 【0066】

「マイクロアレイ」の語は、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。

## 【0067】

「エレメント」または「アレイエレメント」の語は、マイクロアレイの環境において、基質の表面上に配置されたハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドを指す。

## 【0068】

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

## 【0069】

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

## 【0070】

「機能的に結合した」は、第1核酸配列が第2核酸配列と機能的な関係があるように配置された状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。同一のリーディングフレーム内で2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、一般に、機能的に結合したDNA配列は非常に近接するか

、或いは連続し得る。

【0071】

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

【0072】

DETXの「翻訳後修飾」は、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、タンパク分解性分割及びその他の当分野で既知の修飾を含み得る。これらのプロセスは、合成的または生化学的に発生し得る。生化学的修飾は、DETXの酵素環境に依存し、細胞タイプによって変化し得る。

【0073】

「プローブ」は、DETX、DETXの相補配列またはこれらの断片をコードする核酸配列を指し、同一核酸配列、対立遺伝子核酸配列または関連する核酸配列の検出に用いられる。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に結合したものである。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬及び酵素がある。「プライマー」は、短い核酸、通常はDNAオリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に延在し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による核酸配列の増幅(及び同定)に用い得る。

【0074】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるために長めのプローブ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または少なくとも150の連続し

たヌクレオチドからなるようなプローブ及びプライマーを用いてもよい。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。表、図面及び配列リストを含む本明細書に裏付けされた任意の長さのヌクレオチドを用いることができるものと理解されたい。

#### 【0075】

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

#### 【0076】

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

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

#### 【0077】

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

#### 【0078】

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

## 【0079】

「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、翻訳またはRNA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。

## 【0080】

「レポーター分子」とは、核酸、アミノ酸または抗体を標識するのに用いられる化学的または生化学的成分である。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、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。

## 【0081】

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

## 【0082】

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

## 【0083】

「特異結合」または「特異的に結合する」の語は、タンパク質またはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然成分または合成結合成分との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造(例えば抗原決定基即ちエピトープ)であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存していることを意味している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的であれば、エピトープA即ち遊離の非標識A及び抗体を含む反応において、遊離の非標識Aを含むポリヌクレオチドの存在が、抗体に結合する標識A

の量を低減させることになる。

【0084】

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

【0085】

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

【0086】

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

【0087】

「転写イメージ」は、所与の時間、条件での固有の細胞タイプまたは組織による遺伝子発現の集合的パターンを指す。

【0088】

「形質転換」は、外来性のDNAが宿主細胞に入り込み、宿主細胞を変化させるプロセスを表す。形質転換は、当分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、ウイルス感染、電気穿孔法(エレクトロポレーション)、熱ショック、リポフェクション及び微粒子照射を用いる方法がある。「形質転換された」細胞の語には、限られた時間内に挿入されたDNAやRNAを発現するような一時的に形質転換された細胞のみならず、安定的に形質転換された細胞であってその中に挿入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主の染色体の一部として

複製可能であるものも含まれる。

【0089】

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

【0090】

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

る。多型変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。また、多型変異体は、1つのヌクレオチド塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する「一塩基多型」(SNP)を含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

#### 【0091】

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

#### 【0092】

##### 発明

本発明は、新規なヒト解毒タンパク質(DETX)、DETXをコードするポリヌクレオチド、及び、自己免疫/炎症疾患及び癌を含む細胞増殖異常の診断、治療並びに予防にこれらの配列を利用する方法の発見に基づくものである。

#### 【0093】

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

#### 【0094】

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

#### 【0095】

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

#### 【0096】

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

#### 【0097】

配列番号4は、88.80から90.20センチモルガンの間隔内で染色体16にマッピングする。

#### 【0098】

本発明には、DETXの変異体も含まれる。好適なDETXの変異体のアミノ酸配列は、DETXアミノ酸配列と少なくとも約80%、約90%、または約95%もの一致率を有し、DETXの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するような変異体である。

#### 【0099】

本発明には、DETXをコードするポリヌクレオチドも含まれる。一実施例では、本発明には、DETXをコードするような、配列番号3乃至4からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列が含まれている。配列番号3乃至4のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列と同等の価値を有しているが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくシリボースから構成されている。

#### 【0100】

本発明には、DETXをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列も含まれる。具体的には、そのようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、DETXをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約80%、或いは少なくとも約90%、または少なくとも約95%もの一致率を有する。本発明の或る実施態様では、配列番号3乃至4からなる群から選択されたアミノ酸配列と少なくとも約80%、或いは少なくとも約90%、または少なくとも約95%もの一致率を有するような配列番号3乃至4からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、DETXの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するアミノ酸配列をコードし得る。

#### 【0101】

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

明確に開示されているものと考えられる。

#### 【0102】

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

#### 【0103】

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

#### 【0104】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載のポリヌクレオチド配列、特に配列番号3乃至4で示される配列及びそれらの断片にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列も含まれる(Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407、Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.等を参照)。アニーリング条件及び洗浄条件を含めたハイブリダイゼーション条件は、「定義」の項に記載されている。

#### 【0105】

DNAシーケンシングの方法は当分野でよく知られており、DNAシーケンシング方法を用いて本発明の任意の実施例を実施し得る。DNAシーケンシング方法には酵素を用いることができ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUEN

ASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (PE Biosystems, Foster City CA)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ) を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD) において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) 及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (PE Biosystems) 等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (PE Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) または当分野でよく知られている他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する。(Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7、Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853.等を参照)。

#### 【0106】

DETXをコードする核酸配列を、部分的ヌクレオチド配列を利用し且つ当分野でよく知られているPCR法をベースにした種々の方法を用いて伸長させ、プロモーター及び調節要素等の上流配列を検出することができる。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である (Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2:318-322等を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列からなる制限断片から得る (Triglia, T.ら (1988) Nucleic Acids Res 16:8186等を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に関与している (Lagerstrom, M.ら (1991) PCR Methods Applic 1:111-119等を参照)。この方法では、PCRを行う前に多重制限酵素の消化及び連結反

応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている。(Parker, J.D.ら (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoterFinderライブラリ(Clontech, Palo Alto CA)を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア(National Biosciences, Plymouth MN)或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

#### 【0107】

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

#### 【0108】

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

#### 【0109】

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

#### 【0110】

種々の目的（限定するものではないが遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、発現の調節を含む）のために、DETXコード化配列を変えるための、当分野で通常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み換えることが可能である。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド媒介定方向突然変異誘導を利用して、新規な制限部位の生成、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を行う突然変異を導入し得る。

#### 【0111】

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

同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子と再結合し、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指図された制御可能な方法で最大化させることができる。

#### 【0112】

別の実施例によれば、当分野でよく知られている化学的方法を用いて、DETXをコードする配列の全部或いは一部を合成し得る (Caruthers, M.H.ら (1980) *Nucleic Acids Symp. Ser. 7:215-223*, Horn, T.ら (1980) *Nucleic Acids Symp. Ser. 7:225-232*等を参照)。或いは、化学的方法を用いてDETXそれ自体またはその断片を合成し得る。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる (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等を参照)。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ (Perkin Elmer) を用いて達成し得る。更にDETXのアミノ酸配列またはその任意の一部は、直接合成する間及び/または他のタンパク質から得た配列またはその任意の一部と結合する間に変更し、変異型ポリペプチドを生成し得る。

#### 【0113】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製し得る (Chiez, R.M. and F.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421等を参照)。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる (前出のCreighton, pp.28-53等を参照)。

#### 【0114】

生物学的に活性なDETXを発現させるために、DETXをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入することができる。好適な発現ベクターとは即ち好適な宿主内で挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含むベクターである。必要な要素には、ベクター及びDETXをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型プロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列がある。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。固有開始シグナルを用いて、DETXをコードする配列をより効果的に翻訳することが可能もある。このようなシグナルには、AT

G開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。DETXをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。発現の効率は、用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを包含することによって高めることができる (Scharf, D. ら (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162.等を参照)。

#### 【0115】

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

#### 【0116】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、DETXをコードする配列を保持及び発現し得る。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウ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または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) で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系などの微生物等がある (前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509、Bitter, G.A. ら (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; Scorer, C.A. ら (1994) *Bio/Technology* 12:18 1-184; Engelhard, E.K. ら (1994) *Proc. Na*

tl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7: 1937-1945、タカマツ, N. (1987) EMBOJ. 6:307-311、Coruzzi, G. ら (1984) E MBOJ. 3:1671-1680、Broglie, R. ら (1984) Science 224:838-843、Winter, J. ら (1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85-105、『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp.191-196、Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J.J. ら (1997) Nat. Genet. 15: 345-355等を参照)。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、ポリ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. ら (1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):3 50-356、Yu, M. ら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344、Bu ller, R.M. ら (1985) Nature 317(6040):813-815; McGregor, D.P. ら (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、使用する宿主細胞によって限定されるものではない。

#### 【0117】

細菌系では、DETXをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて多数のクローニングベクター及び発現ベクターを選択し得る。例えば、DETXをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング及び増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT 1 プラスミド (Li fe Technologies) などの多機能大腸菌ベクターを用いることができる。DETXをコードする配列の、ベクターの多数のクローニング部位への連結反応によって、lacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌を同定するための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における *in vitro* 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう (Van He ke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509.等を参照)。多量のDETXが必要な場合、例えば抗体を生成する場合などには、DETXの発現を

ハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導性の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し得る。

【0118】

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

【0119】

植物系を使用してDETXを発現することも可能である。DETXをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはTMV（タカマツ, N. (1987) EMBO J 6:307-311）由来のオメガリーダー配列と組み合わせて用いられるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモーターによって促進される。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを用いてもよい（前出のCoruzzi、前出のBroglie、前出のWinter等を参照）。これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である（『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp.191-196等を参照）。

【0120】

哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合、DETXをコードする配列は、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/翻訳複合体に連結反応され得る。可欠E1またはE3領域へウイルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でDETXを発現する感染ウイルスを得ることが可能である（Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659等を参照）。更に、ラウス肉腫ウイルス（RSV）エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞

における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

#### 【0121】

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

#### 【0122】

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

#### 【0123】

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

(Wigler, M. ら (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570、Colbere-Garapin, F. ら (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14 等を参照)。この他の選択可能遺伝子、例えば、代謝のための細胞要求を変える trpB 及び hisD は、文献に記載されている (Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051 等を参照)。可視マーカー、例えばアミノシアニン、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 グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である (Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131 等を参照)。

#### 【0124】

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

#### 【0125】

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

#### 【0126】

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

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

#### 【0127】

当業者には多岐にわたる標識方法及び結合方法が知られており、様々な核酸ア  
ッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。DETXをコードするポ  
リヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼー  
ションプローブ或いはPCRプローブを産出する方法には、オリゴ標識化、ニック  
トランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるPCR  
法がある。或いは、DETXをコードする配列またはその任意の断片を、mRNAプロ  
ーブを産出するためのベクターにクローニングすることも可能である。このような  
ベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP  
6等の好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、in vitroで  
RNAプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersham  
Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、U.S. Biochemical等から市販され  
ている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用  
い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、補助因子、インヒビター、  
磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤等がある。

#### 【0128】

DETXをコードするヌクレオチド配列を用いて形質転換した宿主細胞は、細胞培  
地からのタンパク質の回収及び発現に適した条件下で培養し得る。形質転換細胞  
から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列  
、ベクター、或いはその両者に依存する。当業者であれば理解し得るように、DE

TXをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、原核細胞膜または真核細胞膜を透過するDETXの直接分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計し得る。

#### 【0129】

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

#### 【0130】

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

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

#### 【0131】

本発明の更に別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液またはコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて、放射能標識したDETXの合成が *in vitro* で可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質コード配列の転写及び翻訳を結合する。翻訳は、例えば<sup>35</sup>Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

#### 【0132】

本発明のDETXまたはその断片を用いて、DETXに特異結合する化合物をスクリーニングし得る。少なくとも1個から複数個の試験化合物を用いて、DETXへの特異結合をスクリーニングし得る。試験化合物の例としては、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。

#### 【0133】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドまたはその断片などのDETXの天然リガンド、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. ら (1991) Current Protocols in Immunology 1 (2) の5章等を参照)。同様にして化合物は、DETXが結合する天然受容体に関連し得るか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断片に密接に関連し得る。いずれの場合にも、化合物は既知の技術を用いて合理的にデザインし得る。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は、分泌タンパク質としてまたは細胞膜上のいずれかでDETXを発現する好適な細胞の生成に関与している。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、シヨウジョウバエまたは大腸菌からの細胞がある。DETXを発現する細胞またはDETXを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させ、DETXまたは化合物のいずれかの

結合、刺激または阻害を分析する。

【0134】

アッセイは、試験化合物をポリペプチドに単純に試験結合し得る。ここで、結合は、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される。例えば、アッセイは少なくとも1つの試験化合物を溶液中でDETXと結合するか固体支持体に固定するかのいずれかのステップ及びDETXの化合物への結合を検出するステップを有し得る。或いはアッセイは、標識された競争相手の存在下で試験化合物の結合を検出または測定し得る。更にアッセイは、細胞遊離製剤、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実行することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定し得る。

【0135】

本発明のDETXまたはその断片を用いて、DETXの活性を調整する化合物をスクリーニングし得る。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ある。一実施例においては、DETXが少なくとも1つの試験化合物と結合しているような、DETXの活性を許容する条件下でアッセイが実行され、試験化合物存在下でのDETXの活性が試験化合物不存在下でのDETXの活性と比較される。試験化合物存在下でのDETXの活性の変化は、DETXの活性を調整する化合物を示す。或いは、試験化合物はDETXの活性に適した条件下で活性に適した条件下でDETXを含むin vitroまたは細胞遊離系と結合し、アッセイが実行される。これらアッセイのいずれかにおいて、DETXの活性を調整する試験化合物は間接的にそのようにすることができ、試験化合物と直接接触する必要がなくなる。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し得る。

【0136】

別の実施例では、DETXまたはその哺乳類同族体をコードするポリヌクレオチドは、胚幹(ES)細胞において相同的組換えを用いて動物モデル系内で「ノックアウト」される。このような技術は当技術分野において公知であり、ヒト疾病の動物モデルの生成に有用である(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株化細胞等のマウスES細胞は、初期のマウス胎仔に由来し、培養液中で成長する。ES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝

子等のマーカー遺伝子により分裂させた対象遺伝子 (gene of interest) を含むベクターを用いて形質転換される (neo: Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292)。ベクターは、相同的組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に統合される。或いは、組織特異的または発達段階特異的な様式で対象遺伝子をノックアウトするCre-loxP系を用いて相同的組換えが発生する (Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U. ら (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330)。形質転換されたES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス系統から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠種雌に外科的に導入し、結果として得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを繁殖させてヘテロ接合性系統またはホモ接合性系統を生成する。このようにして産出した遺伝子導入動物は、潜在的治療薬または毒性薬剤を用いて試験し得る。

#### 【0137】

DETXをコードするポリヌクレオチドは、ヒト胚盤胞由来のES細胞における *in vitro* でも操作し得る。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞タイプを含む少なくとも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. ら (1998) Science 282:1145-1147)。

#### 【0138】

DETXをコードするポリヌクレオチドは、モデルヒト疾病への「ノックイン」ヒト化動物 (ブタ) または遺伝子導入動物 (マウスまたはラット) も生成し得る。ノックイン技術を用いて、DETX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、注入された配列は動物細胞ゲノムに統合する。形質転換された細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。ヒトの疾病の治療に関する情報を得るために、遺伝子導入子孫または近交系について研究し、強力な医薬品を用いて遺伝子導入子孫または近交系を処理する。或いは、DETXを過剰発現させるべく例えばDETXを乳内に分泌するなどして同系交配させた哺乳動物は、タンパク質の簡便な源としても役立ち得る (Janne, J. ら (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74)。

#### 【0139】

## 治療

DETXの領域と細胞内シグナル伝達分子間には、化学的及び構造的類似性、例えば配列及びモチーフとの関連における類似性が存在する。更にDETXの発現は、造血/炎症系、神経系、胃腸系及び生殖系の癌に密接に関連している。従ってDETXは、自己免疫/炎症疾患及び癌を含む細胞増殖異常において或る役割を果たすものと考えられる。DETXの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、DETXの発現または活性を低下させることが望ましい。また、DETX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、DETXの発現または活性を増大させることが望ましい。

### 【0140】

従って、或る実施例において、DETX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DETXまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例として自己免疫/炎症疾患が含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析と、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症、外傷が含まれ、また細胞増殖異常も含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色

腫、骨髓腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髓、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれる。

#### 【0141】

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

#### 【0142】

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

#### 【0143】

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

#### 【0144】

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

#### 【0145】

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

#### 【0146】

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

#### 【0147】

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

#### 【0148】

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

#### 【0149】

DETXに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断

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

#### 【0150】

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

#### 【0151】

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

#### 【0152】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る (Orlandi, R. ら (

1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837、Winter, G. ら (1991) Nature 349:293-299等を参照)。

#### 【0153】

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

#### 【0154】

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

#### 【0155】

ラジオイムノアッセイ技術と共に様々な方法、例えばスキャッチャード分析を用いて、DETXに対する抗体の親和性を評価し得る。親和性は結合定数 $K_a$ で表す。 $K_a$ は、平衡状態においてDETX抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除した値であると定義する。ポリクローナル抗体は多様なDETXエピトープに対する親和性が不均一であり、ポリクローナル抗体試薬のために決定した $K_a$ は、DETX抗体の平均親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は特定のDETXエピトープに対して単一特異的であり、モノクローナル抗体試薬のために決定した $K_a$ は、親和性の真の測定値を表す。 $K_a$ 値が約 $10^9 \sim 10^{12}$  L/molの範囲にあるような高親和性抗体試薬は、DETX抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。 $K_a$ 値が約 $10^6 \sim 10^7$  L/molの範

困にあるような低親和性抗体試薬は、DETXが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製及び類似の処理に用いるのが好ましい (Catty, D. (1988) *Antibodies, Volume I: A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC、Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York NY)。

#### 【0156】

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

#### 【0157】

本発明の別の実施例では、DETXをコードするポリヌクレオチド、DETXの任意の断片または相補配列を治療目的で使用することができる。ある実施形態では、DETXをコードするポリヌクレオチドの相補配列がmRNAの転写を阻止するのに好適である場合にこれを使用し得る。具体的には、DETXをコードするポリヌクレオチドに相補的な配列で細胞を形質転換し得る。従って、相補的分子または断片は、DETX活性を調節するため、または遺伝子機能を調節するために使用し得る。このような技術は既に当分野ではよく知られており、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片を、DETXをコードする配列のコード領域または制御領域に延在する様々な位置から設計することが可能である (Agrawal, S., ed. (1996) *Antisense Therapeutics*, Humana Press Inc., Totawa NJ等を参照)。

#### 【0158】

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輸送することが可能である (Slater, J.E. ら (199

8) J. Allergy Clin. Immunol. 102(3):469-475、Scanlon, K.J. ら (1995)9(13):1288-1296.等を参照)。アンチセンス配列はまた、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 (Miller, A.D. (1990) Blood 76:271、前出のAusubel、Uckert, W. and W. Walther (1994) Pharmacol. Ther. 63(3):323-347等を参照)。その他の遺伝輸送機構には、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公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.ら (1998) J. Pharm. Sci. 87(11):1308-1315、Morris, M.C. ら (1997) Nucleic Acids Res. 25(14):2730-2736. 等を参照)。

#### 【0159】

本発明の別の実施例では、DETX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遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療を行うことにより、(i) 遺伝子欠損症 (例えばX染色体鎖遺伝 (Cavazzana-Calvo, M. ら (2000) Science 288:669-672) により特徴付けられる重度の複合型免疫欠損(SCID)-X1の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に関連する重度の複合型免疫欠損 (Blaese, R.M. ら (1995) Science 270:475-480、Bordignon, C. ら (1995) Science 270:470-475)、嚢胞性繊維症 (Zabner, J. ら (1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G. ら (1995) Hum. Gene Therapy 6:643-666、Crystal, R.G. ら. (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因子欠損に起因する血友病 (Crystal, R.G. (1995) Science 270:404-410、Verma, I.M. and Somia, N. (1997) Nature 389:239-242) を治療し、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ (例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(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. ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399)、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、並びに*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ることができる。DETXの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患

を発生させる場合、形質導入した細胞の好適な集団からDETXを発現することにより、遺伝子欠損に起因する症状の発現を緩和し得る。

#### 【0160】

本発明の更なる実施例では、DETXをコードする哺乳動物発現ベクターを作製し、これらのベクターを機械的手段によってDETX欠損細胞に導入することによって、DETXの欠損による疾患や異常症を治療する。in vivo或いはex vitroの細胞に用いる機械的導入技術には、(i) 個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii) バリスティック金粒子輸送 (ballistic gold particle delivery)、(iii) リポソーム媒介形質移入、(iv) 受容体媒介遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポソンの使用 (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) がある。

#### 【0161】

DETX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PC DNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA) 及びPTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) がある。DETXは、(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) または アクチン遺伝子)、(ii) 誘導性プロモーター (例えば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. ら (1995) Science 268:1766-1769、Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456)、市販のInvitrogen社のT-REXプラスミドに含まれる)、エクジソン誘導性プロモーター (Invitrogen社のプラスミドPVGRXR及びPINDから得られる)、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 (前出のRossi, F.M.V. and H.M. Blau)、または (iii) 正常個体由来の、DETX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て、発現させることができる。

## 【0162】

市販のリポソーム形質転換キット（例えばInvitrogen社から入手可能なPerfect Lipid 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になる。別の実施例では、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. ら (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、標準化された哺乳動物の形質移入プロトコルの修飾が必要である。

## 【0163】

本発明の別の実施例では、DETX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)プロモーターまたは独立プロモーターの制御下でDETX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ド配列を伴う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社から市販されており、刊行データ（Riviere, I. ら. (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。ベクターは、好適なベクター産生細胞系（VPCL）において増殖され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する向性を有するエンベロープ遺伝子またはVSVg等の乱交雑エンベロープタンパク質を発現する（Armentano, D. ら (1987) J. Virol. 61:1647-1650、Bender, M.A. ら (1987) J. Virol. 61:1639-1646、Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806、Dull, T. ら (1998) J. Virol. 72:8463-8471、Zufferey, R. ら (1998) J. Virol. 72:9873-9880）。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"）は、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について開示しており、これを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、細胞集団（例えばCD4<sup>+</sup> T細胞）の形質導入

、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. ら (1997) *J. Virol.* 71:7020-7029、Bauer, G. ら (1997) *Blood* 89:2259-2267、Bonyhadi, M.L. (1997) *J. Virol.* 71:4707-4716、Ranga, U. ら (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:1201-1206、Su, L. (1997) *Blood* 89:2283-2290)。

#### 【0164】

別の実施例では、アデノウイルス系遺伝子治療の輸送系を用いて、DETXの発現に関連する1若しくは複数の遺伝子異常を有するような細胞にDETXをコードするポリヌクレオチドを輸送する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。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内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. ら (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は、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号 ("Adenovirus vectors for gene therapy") に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P.A. ら (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:511-544 及び Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

#### 【0165】

更に別の実施例では、ヘルペス系遺伝子治療の輸送系を用いて、DETXの発現に関連する1若しくは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にDETXをコードするポリヌクレオチドを輸送する。HSVが向性を有するような中枢神経系の細胞にDETXを導入する際には、単純ヘルペスウイルス (HSV) 系のベクターの使用は特に役立つ。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス (HSV) I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に輸送するために用いられてきた (Liu, X. ら (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号 ("Herpes simplex virus swains for gene transfer") に開示されており、該特許の引用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制御下において細胞に導入される少なくとも1つの内在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクターについては、Goins, W.F. ら (1999) *J. Virol.* 73:519-532 及び Xu, H. ら (1994) *Dev. Biol.* 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、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形質移入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、当業者に公知の技術である。

#### 【0166】

別の実施例では、アルファウイルス（正の一本鎖RNAウイルス）ベクターを用いてDETXをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に輸送する。プロトタイプのアルファウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス（SFV）の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターが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）。アルファウイルスのRNAを複製中に、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が産出される。このサブゲノムRNAは、完全長のゲノムRNAより高いレベルに複製されるため、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比べてカプシドタンパク質が過剰産生される。同様に、DETXに対するコード配列をカプシドコード領域のアルファウイルスゲノムに導入することにより、ベクター導入細胞において多数のDETXコードRNAが産生され、高レベルのDETXが合成される。通常はアルファウイルスの感染が数日以内での細胞溶解に関係する一方で、シンドビスウイルス（SIN）の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞（BHK-21）の持続的な感染を確立する能力は、アルファウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変更可能であることを示唆している（Dryga, S.A. ら. (1997) *Virology* 228 :74-83）。アルファウイルスの宿主の範囲が広いことにより、様々な細胞タイプへのDETXの導入が可能になる。或る集団におけるサブセットの細胞の特定形質導入は、形質導入前に

細胞の選別を必要とし得る。アルファウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、アルファウイルスのcDNA及びRNAの形質移入方法及びアルファウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

#### 【0167】

例えば開始部位から数えて約 - 10 と約 + 10 の間にある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発現を阻害することも可能である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分に開くような二重らせんの能力を阻害するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある (Gee, J.E. ら (1994) in: Huber, B.E. and B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, pp.163-177等を参照)。相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するべく設計することができる。

#### 【0168】

リボザイムは、酵素性RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するために用い得る。リボザイム作用のメカニズムは、ヌクレオチド鎖切断に先立つ相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションに關与している。例えば、組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子は、DET<sub>X</sub>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。

#### 【0169】

任意の潜在的RNAターゲット内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたりボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、オリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次構造の特徴に対して切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15~20リボヌクレオチドの短いRNA配列を、評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの実施容易性をテストすることによって行うことができる。

## 【0170】

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

## 【0171】

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

## 【0172】

本発明の追加実施例には、DETXをコードするポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物をスクリーニングする方法が含まれる。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物には、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、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を変異し得る。従って、DETXの発現または活性の増加に関連する疾病の治

療においては、DETX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益であり、DETXの発現または活性の低下に関連する疾病の治療においては、DETX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益であり得る。

### 【0173】

特異ポリヌクレオチドの変異発現における有効性に対して、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し得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変異させる場合と、既存の、市販のまたは専売の、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と、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く化合物を合理的にデザインする場合と、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ことが知られているような化合物の化学修飾がある。DETX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され、このように得られる。サンプルには例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、*in vitro*細胞遊離または再構成された生化学系を有し得る。DETXをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、DETX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、特異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量を定量し、それによって1若しく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対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えば *Schizosaccharomyces pombe* 遺伝子発現系 (Atkins, D. ら (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. ら (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:E15) または HeLa 細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. ら (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:8-13) を用いてスクリーニングを実行する。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のためのオリゴヌクレオ

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、修飾オリゴヌクレオチド）の組合せライブラリをスクリーニングすることに関与している（Bruce, T.W. ら（1997）の米国特許第5,686,242号、Bruce, T.W. ら（2000）の米国特許第6,022,691号）。

#### 【0174】

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

#### 【0175】

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

#### 【0176】

本発明の追加実施例は、通常薬剤として許容できる賦形剤で処方される活性成分を有する医薬品成分の投与に関連する。賦形剤には例えば、セルロース、ゴム及びタンパク質がある。様々な処方が通常知られており、詳細はRemington's *Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing, Easton PA)の最新版に記載されている。このような医薬品成分は、DETX、DETXに対する抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはDETXインヒビターから構成し得る。

#### 【0177】

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

#### 【0178】

肺から投与する医薬品成分は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このよう

な医薬品成分は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば伝統的な低分子重量有機薬）の場合には、速効製剤のエアロゾル輸送は当分野で公知である。高分子（例えばより大きなペプチド及びタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺輸送が最近向上したことにより、インスリン等の薬剤を実質的に血液循環へ輸送することが可能になった（Patton, J.S. らの米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射なしに投与する点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーの必要性をなくす。

#### 【0179】

本発明での使用に適した医薬品成分には、所定の目的を達成するために必要なだけの量の活性成分を含有する成分が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。

#### 【0180】

医薬品成分の特殊形状は、DETXまたはその断片を含む高分子を直接細胞内輸送するために調製される。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。或いは、DETXまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質から陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成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することがわかっている（Schwarze, S.R. ら（1999）Science 285:1569-1572）。

#### 【0181】

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

#### 【0182】

治療上の有効投与量は、症状や容態を回復させるような活性分量を参考にする。そのような活性成分の例としては、DETXまたはその断片、DETXの抗体、DETXのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターがある。薬用有効度及び毒性

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

#### 【0183】

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

#### 【0184】

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

#### 【0185】

##### 診断

別の実施例では、DETXの発現によって特徴付けられる疾患の診断のために、或いはDETXやDETXのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤で治療を受けている患者をモニターするためのアッセイにおいて、DETXを特異的に結合する抗体が用

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

#### 【0186】

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

#### 【0187】

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

#### 【0188】

一実施形態では、DETXをコードする核酸配列を同定するために、DETXまたは密接に関連している分子をコードする、ゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブとのハイブリダイゼーションを用いることができる。プローブが、5'調節領域のような高特異領域を有するにせよ、保存されたモチー

フのような低特異領域を有するにせよ、DETX、突然変異体または関連配列をコードする天然の配列しか同定しないのかどうかは、プローブの特異性及びハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェンシーが決定することになる。

【0189】

プローブは、関連する配列の検出にも用いることができ、その配列はDETXをコードする任意の配列と少なくとも50%の相同性をも有し得る。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAとすることができ、配列番号3乃至4の配列、或いはDETX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。

【0190】

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

【0191】

DETXをコードするポリヌクレオチド配列は、DETXの発現に関係する疾患の診断の為に用い得る。限定するものではないがこのような疾患の例として自己免疫/炎症疾患が含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー

症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析と、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、蠕虫の感染症及び外傷が含まれ、また細胞増殖異常も含まれ、その中には日光性角化症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病（MCTD）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症と、腺癌、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、奇形癌を含む癌、具体的には副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌等が含まれる。DETXをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法、ノーザン法、ドットプロット法やその他の膜ベースの技術と、PCR法と、ディップスティック（dipstick）法、ピン及びマルチフォーマットELISA様アッセイと、変異DETXの発現を検出するために患者から採取した体液または組織を利用するマイクロアレイとにおいて使用し得る。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

#### 【0192】

或る形態では、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて、DETXをコードするヌクレオチド配列が有用であり得る。DETX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下で、患者から採取した体液または組織のサンプルに添加することができる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者サンプルのシグナル量が制御サンプルと比べて著しく変化している場合は、サンプル内のDETXをコードするヌクレオチド配列の変異レベルは関連する疾患の存在を示している。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、或いは個々の患

者の治療をモニターするために用いることもできる。

【0193】

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

【0194】

疾患の存在が証明されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返し得る。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

【0195】

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

【0196】

DETXをコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドを追加的に診断上利用することは、PCRの利用に關与し得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いは*in vitro*で産出し得る。オリゴマーは、好ましくはDETXをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはDETXをコードするポリヌクレオチドと相補的ポリヌクレオチドの断片を含み、最適条件下で特定の遺伝子や条件を識別するべく利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリ

ンジェント条件下で、密接に関連している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。

【0197】

或る態様において、DETX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。SNPIは、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、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、制限酵素切断法 (SSCP) 及び蛍光SSCP (fSSCP) がある。SSCPでは、DETX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、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) を用いたDNAの増幅を行う。DNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。DNA内のSNPIは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。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性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などの高処理機器でアンプリマー (amplimer) の検出が可能になる。更に、インシリコSNP (in silico SNP, is SNP) と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列に配列されるような個々の重畳するDNA断片の配列を比較することにより、多型を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調整及び統計モデル及びDNA配列クロマトグラムの自動分析を用いたシーケンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理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。

【0198】

DETXの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (coamplification) 及び標準曲線から得た結果の補間もある (Melby, P.C.ら (1993) J. Immunol. Methods, 159:235-244、Duplaa, C.ら (1993) Anal. Biochem. 212:229-236等を参照)。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または非色応答によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサン

ブルの定量速度を加速することができる。

【0199】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおける標的として用いることができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、米国特許第5,840,484号のSeilhamer, J.J. らの"Comparative Gene Transcript Analysis"に記載されており、この引用を以って本明細書の一部となす。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多型の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬剤の活性を開発及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効的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開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に有効的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択し得る。

【0200】

別の実施例では、DETXに特異的な抗体、DETXまたはその断片をマイクロアレイ上で要素として用い得る。マイクロアレイを用いて、上記のような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ーまたは測定し得る。

【0201】

一実施例は、組織または細胞タイプ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する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプによる遺伝子発現の全体的なパターンを表す。全体的な遺伝子発現パターンは、複数の発現された遺伝子及びその相対存在量を所与の条件及び時間で定量することにより分析する (Seilhamerらの米国特許第5,840,484号 "Comparative Gene Transcript Analysis" を参照。該特許の引用を以って本明細書の一部となす)。従って、特定の組織または細胞タイプの転写または逆転写の全体に本発明のポ

リヌクレオチドまたはその相補体をハイブリダイズすることにより転写イメージを生成し得る。一実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその相補体が複数のマイクロアレイ上のエレメントのサブセットを有し、高処理フォーマットでハイブリダイゼーションが行われる。結果として生じる転写イメージは、遺伝子活性のプロフィールを提供することになる。

#### 【0202】

転写イメージは、組織、株化細胞、生検または生物学的サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。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* で、株化細胞の場合には *in vitro* で遺伝子発現を反映し得る。

#### 【0203】

本発明のポリヌクレオチドの発現プロフィールを作成する転写イメージは、工業的及び天然の環境化合物の毒性試験のみならず *in vitro* モデルシステム及び医薬品の前臨床評価と併せて用い得る。全ての化合物は、しばしば分子フィンガープリントまたは毒物サインと名付けられるような、作用及び毒性のメカニズムを示す特性遺伝子発現パターンを誘導する (Nuwaysir, E.F. ら (1999) Mol. Carcinog. 24:153-159; Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、特別に引用を以って本明細書の一部となす)。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物のサインと類似のサインを有しているのであれば、毒性の特性を共有している可能性がある。これらのフィンガープリントまたはサインは、複数の遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報が含まれている場合には、最も有益且つ洗練されたものである。理想的には、発現をゲノム全体で測定することにより、最高品質のサインが与えられる。任意の試験化合物により発現が変異された遺伝子であっても、これらの遺伝子の発現レベルを用いて発現データの残りを規準化し得るので、同様に重要である。規準化手法は、異なる化合物で処理した後で発現データを比較するのに役立つ。毒物サインのエレメントに対する遺伝子機能の割当は毒性メカニズムの解釈に役立つが、毒性の予測を導くサインを統計学的に一致させるために遺伝子機能の知識は必ずしも必要ではない (例えば米国環境健康科学研究所 (National Institute of Environmental Health Sciences) から2000年2月29日に発行され、<http://www.niehs.nih.gov/oc/news>

/toxchip.htmで利用可能なPress Release 00-02を参照)。従って、毒物サインを用いた毒物学的スクリーニングにおいては、発現された遺伝子配列を全て含めることは重要且つ望ましいことである。

#### 【0204】

一実施例では、試験化合物内で核酸を含有する生物学的サンプルを処理することにより、試験化合物の毒性を算定する。処理生物学的サンプル中で発現されたを、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1若しくは数個のプロープにハイブリダイズし、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し得る。処理生物学的サンプルにおける転写レベルを非処理の生物学的サンプルのレベルと比較する。両サンプルの転写レベルの差は、処理サンプル中において試験化合物により引き起こされる毒性反応を示す。

#### 【0205】

マイクロアレイは、当分野でよく知られている方法を用いて調製し、使用し、そして分析する(Brennan, T.M. ら(1995)の米国特許第5,474,796号、Schena, M. ら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler らの(1995) PCT出願第W095/251116号、Shalon, D. らの(1995) PCT出願第W095/35505号、Heller, R.A. ら(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M.J. らの(1997) 米国特許第5,605,662号等を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、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。該文献は、特別に引用することを以って本明細書の一部となす。

#### 【0206】

本発明の別の実施例では、天然のゲノム配列をマッピングする際に有効なハイブリダイゼーションプロープを産出するため、DETXをコードする核酸配列を用いることが可能である。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列全体で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内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人

工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる (Harrington, J.J. ら (1997) *Nat Genet.* 15:345-355、Price, C.M. (1993) *Blood Rev.* 7:127-134、Trask, B.J. (1991) *Trends Genet.* 7:149-154等を参照)。一度マッピングされた本発明の核酸配列は、例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝または制限断片長多型 (RFLP) と関連させるような遺伝子連鎖地図を発生させるのに用い得る。

#### 【0207】

蛍光原位置ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る (前出のHeinz-Ulrich, ら (1995) in Meyers, pp. 965-968.等を参照)。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上のDETX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は、その疾患に関係するDNAの領域を画定するのに役立つものであり、従って更に位置クローニングする試みとなり得る。

#### 【0208】

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

#### 【0209】

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

#### 【0210】

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

#### 【0211】

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

#### 【0212】

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

#### 【0213】

更に詳細に説明せずとも、当業者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。従って、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的に

すぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

【0214】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第60/142,678号は、言及することをもって本明細書の一部となす。

【0215】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

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

【0216】

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

【0217】

場合によってはStratagene社にRNAを提供し、対応するcDNAライブラリを同社が作製することもあった。そうでない場合は、当分野で公知の推奨方法または類似の方法を用いて、UNIZAPベクターシステム (Stratagene) またはSUPERSCRIPTプラスミドシステム (Life Technologies) を用いてcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した。(前出のAusubel, 1997, unit 5.1-6.6等を参照。) 逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオ

チドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ(300~1000bp)選択は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。cDNAは、好適なプラスミドのポリリンカーの適合性制限酵素部位に連結反応させた。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド(Stratagene)、pSPORT1プラスミド(Life Technologies)またはpINCY(Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)等である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

#### 【0218】

##### 2 cDNAクローンの単離

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

#### 【0219】

別の実施例では、高処理フォーマットにおいて直接結合PCR法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した(Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)及びFluoroskan II蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

#### 【0220】

### 3 シークエンシング及び分析

実施例2で説明したようにして回収したIncyte cDNAは、以下のように配列決定した。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (PE Biosystems) またはPTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) をHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE Biosystems) に与えられた試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム (Molecular Dynamics) が、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373 または377シークエンシングシステム (PE Biosystems) が、或いはその他の当分野でよく知られている配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法 (前出のAusubel, 1997, unit 7.7に概説) を用いて決定した。幾つかのcDNA配列を選択して、実施例6で開示した方法を用いて配列を伸長させた。

#### 【0221】

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

た配列間の一致率をも計算するようなMEGALIGNマルチシーケンスアラインメントプログラム(DNASTAR)に組み入れられた際に、clustalアルゴリズムにより特定されたデフォルトパラメータを用いて生成した。

#### 【0222】

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

#### 【0223】

完全長ポリヌクレオチド及びアミノ酸配列の構築及び分析に用いる上記のプログラムは、配列番号3乃至4からのポリヌクレオチド配列の断片を同定するためにも使用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅に有用な約20~約4000のヌクレオチドの断片は、上記「発明」の項で説明した。

#### 【0224】

#### 4 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、転写された遺伝情報の存在を検出するために用いられる実験

技術であり、標識されたヌクレオチド配列の、特定の細胞種または組織からのRNAが結合される膜へのハイブリダイゼーションに参与している。(前出のSambrook, 7章、同Ausubel. F.M. ら, 4章及び16章等を参照。)

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

【0225】

【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

【0226】

プロダクトスコアは、2つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両者を考慮している。プロダクトスコアは、0～100の規準化された値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアリングセグメント対(HSP)に一致する各塩基に+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得る)。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プロダクトスコアを計算する。プロダクトスコアは、断片的重畳とBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えばプロダクトスコア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%一致する場合のみ得られる。プロダクトスコア70は、一端が100%一致し、70%重畳しているか、他端が88%一致し、100%重畳しているかのいずれかの場合に得られる。プロダクトスコア50は、一端が100%一致し、50%重畳しているか、他端が79%一致し、100%重畳しているかのいずれかの場合に得

られる。

#### 【0227】

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

#### 【0228】

##### 5 ポリヌクレオチドをコードするDETXの染色体マッピング

配列番号3乃至4を配列するために用いたcDNA配列は、BLAST及びその他のスミス ウォーターマンアルゴリズムのインプリメンテーションを用いて、Incyte LIFESEQのデータベース及びパブリックドメインのデータベースから得た配列と比較した。配列番号3乃至4に適合するデータベースから得た配列は、Phrap (表5) 等のアセンブリアルゴリズムを用いて隣接する配列及びオーバーラップする配列のクラスタに配列した。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスタ化された配列が予めマッピングされたかを測定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている結果、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

#### 【0229】

配列番号4の遺伝地図上の位置については、ヒト染色体の範囲または間隔として「発明」の項に記載されている。センチモルガン間隔の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に關連して測定する。(センチモルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均すると、1 cMはヒト中のDNAの1メガベース (Mb) にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポッ

ト及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する。) cM距離は、配列が各ク  
ラスト内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対して境界を提供する  
ようなGenethonによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。

### 【0230】

#### 6 ポリヌクレオチドをコードするDETXの伸長

配列番号3乃至4の完全長の核酸配列は、完全長分子の適切な断片から設計し  
たオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。一方の  
プライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは  
既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さ  
が約22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68~72の  
温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア(National  
Biosciences) 或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘア  
ピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長  
は全て回避した。

### 【0231】

選択したヒトcDNAライブラリを用いて配列を伸長させた。2段階以上の伸長が  
必要または望ましい場合には、付加的プライマー或いはプライマーのネステッド  
セットを設計した。

### 【0232】

当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって、高忠実度の増幅が  
得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー(MJ Research, Inc.)を用いて  
96穴プレート内で行った。反応混合液には、DNA鋳型、各プライマー200 nmo  
lと、Mg<sup>2+</sup>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 及びβ-メルカプトエタノールを含む反応緩衝液と、Taq  
DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)と、ELONGASE酵素(Life Tech  
nologies)と、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)が含まれていた。プライマ  
ー対PCI A、PCI Bに対して用いたパラメータは次の通りである。

ステップ1: 94 で3分間

ステップ2: 94 で15秒

ステップ3: 60 で1分間

ステップ4： 68 で2分間

ステップ5： ステップ2、3、4を20回繰り返す

ステップ6： 68 で5分間

ステップ7： 4 で保存

プライマー対T7、SK+に対しては、上記パラメータに代えて以下のパラメータを用いた。

ステップ1： 94 で3分間

ステップ2： 94 で15秒

ステップ3： 57 で1分間

ステップ4： 68 で2分間

ステップ5： ステップ2、3、4を20回繰り返す

ステップ6： 68 で5分間

ステップ7： 4 で保存

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

### 【0233】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)を用いて消化し、pUC 18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)への再連結反応前に音波処理またはせん断した。ショットガン・シーケンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度(0.6~0.8%)のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE(Promega)で消化した。伸長させたクローンをT4リガーゼ(New England Biolabs, Beverly MA)を用いてpUC 18ベクタ

ー (Amersham Pharmacia Biotech) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で処理して制限部位のオーバーハングを満たし、コンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を抗生物質含有培地上で選択し、個々のコロニーを選択してLB/2x carb液体培地の384穴プレート内において37℃で一晩培養した。

#### 【0234】

細胞を溶解し、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) 及びPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いてPCRによってDNAを増幅した。その際用いたパラメータは次の通りである。

ステップ1 : 94℃で3分間

ステップ2 : 94℃で15秒

ステップ3 : 60℃で1分間

ステップ4 : 72℃で2分間

ステップ5 : ステップ2、3、4を29回繰り返す

ステップ6 : 72℃で5分間

ステップ7 : 4℃で保存

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

#### 【0235】

同様に、伸長のために設計されたオリゴヌクレオチド及び適切なゲノムライブラリと共に上記手順を用いて5'調節配列を得るために、配列番号3乃至4のヌクレオチド配列が用いられる。

#### 【0236】

##### 7 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

配列番号3乃至4由来のハイブリダイゼーションプローブを利用して、cDNA、

ゲノムDNAまたはmRNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 等の最新ソフトウェアを用いて設計し、50 pmolの各オリゴマーと、250  $\mu$ Ciの[ $^{-32}$ P]アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) と、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを結合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストランビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba IまたはPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 $10^7$ カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

#### 【0237】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytan Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは、40 で16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば0.1  $\times$  クエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィーまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

#### 【0238】

### 8 マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの連鎖または合成は、フォトリソグラフィ、圧電印刷 (インクジェット印刷、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質は、均一且つ非多孔性の固体とするべきである (Schna (1999).前出)。推奨する基質には、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。或いは、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、熱的、紫外線の、

化学的または機械的結合手順を用いて基質の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る (Schen, M. ら (1995) Science 270:467-470、Shalon, D. ら (1996) Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. and J. Hodgson (1998) Nat. Biotechnol. 16:27-31.を参照)。

#### 【0239】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片 (EST)、またはその断片またはオリゴマーは、マイクロアレイのエレメントを構成し得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片またはオリゴマーを、LASERGENEソフトウェア (DNASTAR) 等の当分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメントは、生物学的サンプル中でポリヌクレオチドを用いてハイブリダイズされる。生物学的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接合される。ハイブリダイゼーション後、生物学的サンプルからハイブリダイズされていない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いてハイブリダイゼーションを検出する。或いは、レーザ脱着及び質量スペクトロメトリ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度合及び相対存在度は、算定し得る。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。

#### 【0240】

##### 組織または細胞サンプルの準備

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)セルローズ法を用いてポリ(A)<sup>+</sup>RNAを精製する。各ポリ(A)<sup>+</sup>RNAサンプルは、MMLV逆転写酵素、0.05 pg/ $\mu$ lのオリゴ(dT)プライマー (21mer)、1 $\times$ 第1鎖緩衝液、0.03 unit/ $\mu$ lのRNアーゼ阻害因子、500  $\mu$ MのdATP、500  $\mu$ MのdGTP、500  $\mu$ MのdTTP、40  $\mu$ MのdCTP、40  $\mu$ MのdCTP-Cy3 (BDS) またはdCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット (Incyte) を用いてポリ(A)<sup>+</sup>RNA含有の25体積ml内で行う。特異制御ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、370 で2時間インキュベートした後、in vitro転写

により非コード酵母ゲノムDNAから合成する。各反応サンプル（1つはCy3、もう1つは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を分解する。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）を用いて精製し、結合させた後に、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両反応サンプルをエタノール沈殿させる。次に、SpeedVAC（Savant Instruments Inc., Holbrook NY）を用いてサンプルを乾燥して仕上げ、14  $\mu$ lの5  $\times$  SSC / 0.2% SDS中で再懸濁する。

#### 【0241】

##### 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成する。各アレイエレメントは、クローン化cDNAインサートによりベクター含有細菌性細胞から増幅する。PCR増幅は、cDNAインサートの側面に位置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で1~2 ngの初期量から5  $\mu$ gより大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅したアレイエレメントは、SEPHACRYL-400（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて精製する。

#### 【0242】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。処理中及び処理後に、大量の蒸留水洗液を用いて、0.1%のSDS及びアセトン中で、超音波により顕微鏡スライドガラス（Corning）を洗浄する。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%エタノール中で0.05%アミノプロピルシラン（Sigma）を用いてコーティングする。

#### 【0243】

米国特許第5,807,522号で説明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。該特許は、引用を以って本明細書の一部となす。平均濃度が100 ng/ $\mu$ lのアレイエレメントDNA 1  $\mu$ lを高速ロボット

装置により開口キャピラリープリントエレメントに充填する。装置はここで、スライド毎に約5nlのアレイエレメントサンプルをデポジットする。

#### 【0244】

マイクロアレイには、STRATALINKER UV架橋剤 (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度洗浄し、蒸留水で3度洗浄する。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) 中の0.2%カゼイン中において60で30分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように0.2%SDS及び蒸留水で洗浄することにより、非特異結合部位をブロックする。

#### 【0245】

##### ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応には、5×SSC, 0.2%SDSハイブリダイゼーション緩衝液中にCy3及びCy5標識したcDNA合成生成物を各0.2µg含む9µlのサンプル混合液を用いる。サンプル混合液は、65まで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して1.8cm<sup>2</sup>のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きいキャビティを有する防水チェンバーに移行させる。チェンバーのコーナーに140µlの5×SSCを加えることにより、チェンバー内部を湿度100%に保持する。アレイを含むチェンバーは、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分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中(0.1×SSC)において45で10分間各々3度洗浄して乾燥させる。

#### 【0246】

##### 検出

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体は、Cy3の励起のためには488nm、Cy3の励起のためには632nmでスペクトル線を生成し得るInnova 70混合ガス10Wレーザ (Coherent, Inc., Santa Clara CA) を備えた顕微鏡で検出する。20×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光を集中させる。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、対物レンズを通過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した。

#### 【0247】

2つの異なるスキャンのうち、混合ガスマルチラインレーザは2つの蛍光体を連続的に励起する。放射された光は、2つの蛍光体に応じて波長に基づき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間に設置された好適なフィルタを用いて、シグナル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。装置は両蛍光体からのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザ源において好適なフィルタを用いて各アレイを通常2度スキャンし、蛍光体1つにつき1度スキャンする。

#### 【0248】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合液に添加されたcDNA対照種が発す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配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度をハイブリダイジング種の重量比1:100,000に相関させる。異なる源からの2つのサンプル(例えば代表的な試験細胞及び制御細胞)であって各々異なる蛍光体で標識したものを単一のアレイにハイブリダイズし、他と異なって発現された遺伝子を同定する場合には、2つの蛍光体を有する較正cDNAの標識サンプルを標識し、各々等量をハイブリダイゼーション混合液に加えて較正を行う。

#### 【0249】

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(A/D)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、或るイメージとして表示され、シグナル強度は、リニア20色変換を用いて、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までに及ぶ擬似カラー範囲にマッピングされる。データは、定量的にも分析される。2つの異なる蛍光体の励起及び測定を同時に行う場合には、先ず、各蛍光体の発光スペクトルを用いて両蛍光体間の(重複発光スペクトルに起因する)光学クロストークにデータを補正する。

## 【0250】

グリッドは蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。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。

## 【0251】

## 9 相補的ポリヌクレオチド

DETXをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的配列は、天然のDETXの発現を検出し、低下させ、または阻害するために用いられる。約15～30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.0ソフトウェア (National Biosciences)、及びDETXをコードする配列を用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモータ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、DETXをコードする転写物にリボソームが結合しないように相補的オリゴヌクレオチドをデザインする。

## 【0252】

## 10 DETXの発現

DETXの発現及び精製は、細菌またはウイルスをベースにした発現系を用いて行うことができる。細菌でDETXを発現するために、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、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21 (DE3) 等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導されるとDETXを発現する。真核細胞でのDETXの発現は、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) を昆虫細胞株または哺乳

乳動物細胞株に感染させて行う。バキュロウイルスの可欠ポリヘドリン遺伝子を、相同的組換え、或いは転移プラスミドの媒介に関与する細菌媒介遺伝子転移のどちらかによって、DETX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。(Engelhardt, E. K.ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V.ら (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照)。

### 【0253】

殆どの発現系では、融合タンパク質としてDETXを合成するのに例えばグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) またはペプチドエピトープ標識、例えばFLAGや6-Hisを用いる。これらを用いることにより、未精製細胞溶解物から組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製を迅速に1ステップで行うことができる。GSTは日本住血吸虫からの26kDaの酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする (Amersham Pharmacia Biotech)。精製後、GSTの部分を特定の開発部位においてDETXからタンパク質分解的に切断することが可能である。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体 (Eastman Kodak) を用いて免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂 (QIAGEN) 上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のAusubel (1995) 10章、16章に記載されている。これらの方法で精製したDETXを直接用いて実施例11及び15のアッセイを行うことができる。

### 【0254】

#### 1.1 DETX活性の実証

例として、DETX分子のガラクトシターゼ活性を測定するアッセイについて記述する。微量定量プレート上において37℃で5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside溶液 (1 mg/mlの5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyran

oside、2 mM塩化マグネシウム、0.02%ノニデットP-40、0.01%デオキシコール酸ナトリウム、5 mMフェリシアン化カリウム、5 mMフェリシアン酸カリウム(in PBS)を用いて種々の量のDETXをインキュベートする。サンプルの吸光度は、1時間間隔、600 nmで、分光測定で測定する。サンプルの吸光度は、サンプル中のDETXの活性に比例する(Palmer, C.N.A. ら (1998) J. Biol. Chem. 273(29):18109-18116)。

## 【0255】

### 1.2 機能的アッセイ

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

の変化とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M. G. (1994) *Flow Cytometry Oxford, New York, NY.*に記述がある。

#### 【0256】

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

#### 【0257】

##### 1.3 DETX特異抗体の産生

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE ; Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 182:488-495等を参照) または他の精製技術を用いて実質上精製されたDETXは、ウサギの免疫化及び標準プロトコルを用いた抗体産出に用いる。

#### 【0258】

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

#### 【0259】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、Fmocケミストリを用いるABI 431A ペプチドシンセサイザ (PE Biosystems) を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫抗原性を高める (前出のAusubel, 1995 等を参照)。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチ

D-KLM複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗DETX活性を検査するには、ペプチドまたはDETXを基質に結合し、1%BSAを用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素で標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

#### 【0260】

##### 1.4 特異抗体を用いた天然のDETXの精製

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

#### 【0261】

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

#### 【0262】

##### 1.5 DETXと相互作用する分子の同定

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

#### 【0263】

或いは、DETXと相互作用する分子は、Fields, S. 及び O. Song (1989, Nature 340:245-246) に記載されているような酵母2ハイブリッドシステムを用いて分析するか、またはMATCHMAKERシステム (Clontech) 等の2ハイブリッドシステ

ムに基づく市販のキットを用いて分析する。

【0264】

高処理の方法で酵母2ハイブリッドシステムを利用し、遺伝子の2大ライブラリに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ようなPATHCALLINGプロセス(CuraGen Corp., New Haven CT)にもDETXを用い得る(Nandabalan, K.ら(2000)米国特許第6,057,101号)。

【0265】

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

【0266】

(表の簡単な説明)

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

【0267】

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

【0268】

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

【0269】

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

【0270】

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

【表1】

表1

タンパク質 SEQ ID NO:	ヌクレオチド SEQ ID NO:	クローン ID	ライブラリ	断片
1	3	3751586	UTRSNOT18	1364556R6 (SCORN02), 2321304H1 (OVARNOT02), 3702868F6 (PENCNOT07), 3702868T6.comp (PENCNOT07), 3751586H1 (UTRSNOT18)
2	4	4369745	THYMN0T11	207974R1 (SPLN0T02), 414055R1 (BRSTN0T01), 1304575F1 (PLACN0T02), 1374404H1 (BSTMN02), 1435752F1 (PANCN0T08), 1666042F6 (BRSTN0T09), 1704562F6 (DUODN0T02), 4369745H1 (THYMN0T11)

【表2】

表2

SEQ ID NO:	アミノ酸残基	リン酸化可能部位	グリコシレーション可能部位	サイン配列、モチーフ、及びドメイン	ホモログ配列	分析方法及びデータベース
1	234	S58 T75 T130 S204 S87 S215 T223	N94	シグナルペプチド: M1-A27	ダウン症候群発症領域 ホモログ (g2618743)	BLAST-GenBank SPScan MOTIFS MOTIFS
2	388	T19 S21 S43 S75 S125 S164 S207 S235 S236 T246 S38 Y285 Y315	N184	シトクロムcファミリー ヘム結合部位: G338-V343		

【表3】

表3

ヌクレオチド SEQ ID NO:	選択断片	発現組織 (割合)	疾患または症状 (割合)	ベクター
3	86-130	神経 (0.308) 生殖 (0.308) 筋骨格 (0.154)	炎症 (0.308) 癌 (0.231) 細胞増殖 (0.154)	PINCY
4	189-248	生殖 (0.321) 胃腸 (0.170) 神経 (0.113)	癌 (0.434) 炎症 (0.434) 細胞増殖 (0.170)	PINCY

【表4】

表4

ライブラリの説明		ライブラリ	クローンID	配列ID番号
ライブラリは、腹式子宮全摘出術、両側卵巣摘出術、及び膀胱ヘルニア修復の際に、3歳の白人女性より子宮内膜細胞より単離したRNAを用いて作製された。病理学的には、子宮内膜が増殖期にあったことを示していた。右卵巣は黄体嚢胞を示していた。病歴には、出血性卵巣嚢胞、及び子宮内膜症が有った。家族歴には、高脂血症、急性心筋梗塞、アテローム性冠動脈疾患、及び2型糖尿病があった。		UTRSNOT18	3751586	3
ライブラリは、胸腺切除術及び房室間瘻のバッチ閉鎖の際に二歳の白人女性胎児より摘出された胸腺組織より単離したRNAを用いて作製された。患者は先天性な心臓奇形を示した。病歴には両心房左室結合及び右心室痕跡、肺高血圧、チアノーゼ、大動脈弁下部狭窄、発作、及び頭蓋底の骨折が有った。家族歴には逆流性腎症があった。		THYMNOT11	4369745	4

【表5】

表5-1

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター閾値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して不定の塩基をマスクするプログラム。	P-E 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。	P-E 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。	P-E 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、構造的フィンガープリント領域を探索する。	Henikoff, S and J.G. Henikoff, Nucl. Acid Res., 19:6565-72, 1991. J.C.; Henikoff and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; Artwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37: 417-424.	スコア=1000 以上 スコア/強度=0.75 以上 該当する場合、確率値=1.0E-3 以下
HMMER	PFAM 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わせ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322.	スコア=10-50 ビット、各タンパク質ファミリーによって異なる。

【表6】

表5-2

プログラム名	説明	引用文献	パラメーター関連値
ProfileScan	Prosite で定義された配列パターンと一致するタンパク質配列における構造及び配列のモチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M.他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221	ノーマライズされた質のスコア $\geq$ 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読出しアルゴリズムである。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づく SWAT や CrossMatch を含む 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ャンして分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み付けマトリクス解析プログラムである。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10: 1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12: 431-439.	スコア=3.5 以上
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 前出; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

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

<120> HUMAN PROTEINS INVOLVED IN DETOXIFICATION

<130> PF-0711 PCT

<140> To Be Assigned  
<141> Herewith

<150> 60/142,678  
<151> 1999-07-07

<160> 4  
<170> PERL Program

<210> 1  
<211> 234  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Incyte ID No: 3751586CD1

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

<210> 2  
<211> 388  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 4369745CD1

<400> 2  
 Met Lys Ile Arg Thr Glu Ala Pro Gly Asn Leu Arg Leu Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Pro Thr Arg Ser Glu Lys Glu Gln Val Ser Ile Ser Ser  
 20 25 30  
 Phe Tyr Tyr Lys Glu Arg Lys Ser Arg Arg Trp Lys Ser Lys Arg  
 35 40 45  
 Glu Gly Ser Asp Ser Gly Asn Arg Gln Ile Lys Ala Ala Gly Lys  
 50 55 60  
 Val Ile Ile Gln Asp Ile Ala Cys Leu Leu Pro Val His Lys Ser  
 65 70 75  
 Leu Gly Glu Leu Tyr Ile Leu Asn Val Asn Asp Ile Gln Glu Thr  
 80 85 90  
 Cys Gln Lys Asn Ala Ala Ser Ala Leu Leu Val Gly Arg Lys Asp  
 95 100 105  
 Leu Val Gln Val Trp Ser Leu Ala Thr Val Ala Thr Asp Leu Cys  
 110 115 120  
 Leu Gly Pro Lys Ser Asp Pro Asp Leu Glu Thr Pro Trp Ala Arg  
 125 130 135  
 His Pro Phe Gly Arg Gln Leu Leu Glu Ser Leu Leu Ala His Tyr  
 140 145 150  
 Cys Arg Leu Arg Asp Val Gln Thr Leu Ala Met Leu Cys Ser Val  
 155 160 165  
 Phe Glu Ala Gln Ser Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Pro Phe Gly  
 170 175 180  
 Pro Phe Pro Asn Arg Ser Ser Asn Leu Val Val Ser His Ser Arg  
 185 190 195  
 Tyr Pro Ser Phe Thr Ser Ser Gly Ser Cys Ser Ser Met Ser Asp  
 200 205 210  
 Pro Gly Leu Asn Thr Gly Gly Trp Asn Ile Ala Gly Arg Glu Ala  
 215 220 225  
 Glu His Leu Ser Ser Pro Trp Gly Glu Ser Ser Pro Glu Glu Leu  
 230 235 240  
 Arg Phe Gly Ser Leu Thr Tyr Ser Asp Pro Arg Glu Arg Glu Arg  
 245 250 255  
 Asp Gln His Asp Lys Asn Lys Arg Leu Leu Asp Pro Ala Asn Thr  
 260 265 270  
 Gln Gln Phe Asp Asp Phe Lys Lys Cys Tyr Gly Glu Ile Leu Tyr  
 275 280 285  
 Arg Trp Gly Leu Arg Glu Lys Arg Ala Glu Val Leu Lys Phe Val  
 290 295 300  
 Ser Cys Pro Pro Asp Pro His Lys Gly Ile Glu Phe Gly Val Tyr  
 305 310 315  
 Cys Ser His Cys Arg Ser Glu Val Arg Gly Thr Gln Cys Ala Ile  
 320 325 330  
 Cys Lys Gly Phe Thr Phe Gln Cys Ala Ile Cys His Val Ala Val  
 335 340 345  
 Arg Gly Ser Ser Asn Phe Cys Leu Thr Cys Gly His Gly Gly His  
 350 355 360  
 Thr Ser His Met Met Glu Trp Phe Arg Thr Gln Glu Val Cys Pro  
 365 370 375  
 Thr Gly Cys Gly Cys His Cys Leu Leu Glu Ser Thr Phe  
 380 385

<210> 3  
 <211> 934  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Incyte ID No: 3751586CB1

```

<400> 3
agaatcatac ttcacatggaa tgaggagccc agggcagcag ggacacgtcc ctgaagatgg 60
aggacttttc ttactgtgct gcatagacag ggactgggct gtcactcgtt gttttgcaga 120
agaagccttt caagcaatca ctgacttcaa tgacctcccc aactcgttgt ttgcgtgcaa 180
tgttcaccag tcagtgtttg aaggagaaga gagcaaggaa aaatttgagg gactgtttcg 240
gacttatgat gactgtgtga cgttccagct atttaagagt ttcagacgtg tccgtataaa 300
cttcagcaat cctaaatctg cagcccagagc taggatagag cttcatgaaa cccaattcag 360
agggaaaaaaa ttaaagctct actttgcaca ggttcagact ccagagacag atggagacaa 420
actgcacttg gctccacccc agcctgccaa acagtttctc atctcgcgcc ctctctccc 480
acctgtttggc tggcagccca tcaacgatgc caccgagtc ctcaactatg acctccteta 540
tgctgtggcc aaactaggac caggagagaa gtatgagctc catgcaggga ctgagtcacc 600
cccaagtgtc gtcgtgcacg tgtgcgacag tgcacatagag gaagaagagg acctaaagac 660
ttccccaaag ccaaaaatca tccaaactcg gcgtcctggc ctgccaccct ccgtgtccaa 720
ctgagctgcc tgctccttct cgataatagc cgtctcctct ttateatgct ttttcccct 780
gttggtttgtc aaaaaaaaaatt gcctttaaat tcttgggtgt ttggttgttt gagattcctt 840
ccttgttate aagcctctcg gacaaaaggc ctaggaaaag gtgatatgct tctgatcat 900
atcatacca ttaagtataa cccattattt agaa 934

```

```

<210> 4
<211> 1890
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4369745CB1

```

```

<400> 4
ctcccacaga gcctactccg agatctctct cagccttgct tgcttatcac actggcttga 60
tcgcgcccat gaagatccgc acagaggccc ctgggaacct tcgtttatac agtgggagcc 120
ccactcgcag cgagaaagag caggtctcca tcagctcctt ctactacaag gagcggaaat 180
caagacgatg gaaaagtaag cgtgagggat cagactctgg caatcgacag atcaaggctg 240
ctgggaaagt catcatccag gatattgctt gcctcctgcc tgttcacaaa tcgctgggag 300
agctgtacat attgaatgtg aatgatattc aggaacatg tcagaagaat gccgcctctg 360
ccttgctcgt tggaagaaaag gatcttgtcc aggtttggtc gctggctacg gtagctacag 420
atctttgcct tggtcogaaa tctgaccagc atttggaaac accctgggct cgacatccat 480
ttggggggca gctgctggag tccctgttgg ctcaactatt ccggctccgg gatgttcaga 540
cactggcgat gctctgtagc gtgtttgaaag cccagctctc gcctcagggg ctaccaaacc 600
cctttgggccc ttttctaac cgttcttcta atcttgtggt gtcccatagt cgatatceta 660
gctttacctc ttctggttcc tgctccagta tgcagaccct agggctcaac actggcggct 720
ggaacatagc gggaagagag gcagagcact tgcctcccc ttggggagaa tctcaccag 780
aagagctccg ctttgggagt ctgacctaca gtgatcccc tgagcgagaa cgtgaccagc 840
atgataaaaa taaaaggctc ctggacccc ccaatacca gcaatttgat gactttaaga 900
aatgctatgg ggaaatctc taccgttggg gtctgagaga gaagcgagct gaagtgttga 960
agtttgtctc ctgtcctcct gaccctcaca aagggatcga gttcggcgtg tactgcagcc 1020
actgcgggag tgaggtcctt gccacgcagt gtgccatctg caaaggcttc acgttccagt 1080
gtgccatctg tcacgtggct gtgcggggat cgtccaattt ctgcctgacc tgtgggcaag 1140
gtggccacac cagccacatg atggagtggc ttccgaccca ggaggtgtgt cccaccgggt 1200
gtgggtgcca ctgctgctt gaaagcactt tctgaacctc cagaagtgg gtattgtctg 1260
aaatcccaga ggaccataa gtgccggtga caagctgtct gtcaggggag aggcctcaga 1320
acctgggttc gtccccagtg agaccggagg atgatcccc aaggactgcg cagcatcagc 1380
tcttgggtgg cctctgcctt ctcttctgtt tggccaacct gtgtggatgt cactgtgtga 1440
agataaggac agaagtgcag agctgcctt tgtgtgttgt ctatgtcggc tgagctacca 1500
aggtggaagt tttcatggag aaaagcacct ggctccaggg ccagtgttac agtgttacc 1560
tgtaagggtg tagccttaaa ccaccgagca gcgttctctt gatgccagtg cagagaccag 1620
agtcagatgc ccgaggacag tgggtaggaa tttcatcaac aaatggacct atggcatcat 1680
ggctttagaa gctggtacat ttaactgagc gatggacagt ggcttcttaa aatatgacac 1740
ttaaattgta aatatgcact gtacttaagg attcttaaga tgtattttt tgtatttct 1800
cctccagctg ctatcccttg gctaataaaa ttctagtaat ttgaaaaaaa aaaaaaagag 1860
agaaaagttaa acaacaaaaa aaaaaaaaaa 1890

```

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int. Application No PCT/US 00/18509
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 C12N15/11	C07K14/47 C07K16/18
	A61K38/00 A01K67/027	G01N33/68 C12Q1/68
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		
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, BIOSIS, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MIYAZAKI TAKASHI ET AL: "Molecular cloning of a novel thyroid hormone-responsive gene, ZAKI-4, in human skin fibroblasts." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 24, 1996, pages 14567-14571, XP002152090 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,3,6,7, 9-15
A	US 5 874 248 A (CORLEY NEIL C ET AL) 23 February 1999 (1999-02-23) the whole document	1-19,22, 25-28
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  7 November 2000		Date of mailing of the international search report  13.02.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Oderwald, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/18509

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALBERTS B ET AL: "MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL" MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL,US,BETHESDA, MD, 1994, pages 575-580, XP002152091 ISSN: 1059-1524 cited in the application the whole document ---	
P,X	ROTHERMEL BEVERLY ET AL: "A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 12, 24 March 2000 (2000-03-24), pages 8719-8725, XP002152092 ISSN: 0021-9258 the whole document -----	1,3,6,7, 9-15,19, 22,25-28

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/18509**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

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

1-28 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: {1-28 all partially}

An isolated polypeptide comprising amino acid sequence SEQ ID NO: 1 (DETX-1), an isolated polynucleotide encoding said polypeptide (SEQ ID NO: 3). A cell, a transgenic organism, an antibody, a pharmaceutical composition, methods for producing a polypeptide, for detecting a target polynucleotide, for treating a disease and for screening compounds.

2. Claims: {1-28 all partially}

same as invention 1 but comprising SEQ ID NO: 2 and 4 (DETX-2).

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20, 21, 23, 24

Claims 20, 21, 23 and 24 refer to an agonist or antagonist of the polypeptide without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/18509

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874248 A	23-02-1999	US 5919450 A	06-07-1999

## 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 K 45/00		A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 4
48/00		1/16	4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/00		3/00	4 C 0 8 7
1/16		3/10	4 H 0 4 5
3/00		5/00	
3/10		5/14	
5/00		7/00	
5/14		7/06	
7/00		9/10	
7/06		11/06	
9/10		11/16	
11/06		13/10	
11/16		17/00	
13/10		17/06	
17/00		19/02	
17/06		19/10	
19/02		21/04	
19/10		25/00	
21/04		29/00	
25/00			1 0 1
29/00		31/04	
	1 0 1	31/10	
31/04		31/12	
31/10		31/18	
31/12		33/00	
31/18		35/00	
33/00		37/06	
35/00		37/08	
37/06		43/00	1 0 5
37/08			1 1 1
43/00	1 0 5	C 0 7 K 14/47	
	1 1 1	16/18	
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15	
16/18		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21		C 1 2 Q 1/68	A
5/10		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02		33/50	Z
C 1 2 Q 1/68		33/53	M
G 0 1 N 33/15		33/566	
33/50		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/53		5/00	A
33/566		A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB51 CB01 FB01  
FB02 FB03 FB08  
4B024 AA01 AA11 AA12 BA80 CA04  
DA02 DA05 DA12 EA04 FA02  
GA11 HA12 HA15  
4B063 QA01 QA19 QA20 QQ08 QQ43  
QR08 QR42 QR56 QS25 QS34  
QX02  
4B064 AG01 CA01 CA05 CA06 CA10  
CA19 CC24 DA01 DA05 DA12  
DA13  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X  
AB01 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01  
BA02 BA08 BA22 BA23 CA53  
CA56 DA01 DA27 DA41 DB01  
NA14 ZA012 ZA452 ZA512  
ZA532 ZA552 ZA592 ZA602  
ZA662 ZA752 ZA812 ZA892  
ZA902 ZA962 ZA972 ZB012  
ZB112 ZB132 ZB152 ZB262  
ZB332 ZB372 ZC022 ZC032  
ZC062 ZC312 ZC352 ZC552  
4C085 AA13 AA14 BB11 DD21 DD62  
DD63 EE01  
4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA01  
ZA45 ZA51 ZA55 ZA59 ZA60  
ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA90  
ZA94 ZA96 ZA97 ZB01 ZB11  
ZB13 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35  
ZB37 ZC02 ZC03 ZC06 ZC31  
ZC35 ZC55  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
CA40 DA75 EA22 EA28 EA50  
EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	人体蛋白参与解毒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003517292A</a>	公开(公告)日	2003-05-27
申请号	JP2001509509	申请日	2000-07-06
[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	タングワイトム ユエヘンリー		
发明人	タング、ワイトム ユエ、ヘンリー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/00 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/06 A61P11/16 A61P13/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P11/06 A61P11/16 A61P13/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/47		
FI分类号	A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/00 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/06 A61P11/16 A61P13/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/CA01 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA12 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DA01 4C084/DA27 4C084/DA41 4C084/DB01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA452 4C084/ZA512 4C084/ZA532 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA602 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA902 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB012 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZB372 4C084/ZC022 4C084/ZC032 4C084/ZC062 4C084/ZC312 4C084/ZC352 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA45 4C087/ZA51 4C087/ZA55 4C087/ZA59 4C087/ZA60 4C087/ZA66 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA90 4C087/ZA94 4C087/ZA96 4C087/ZA97 4C087/ZB01 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4C087/ZB37 4C087/ZC02 4C087/ZC03 4C087/ZC06 4C087/ZC31 4C087/ZC35 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/142678 1999-07-07 US		

摘要(译)

本发明提供了人排毒蛋白 ( DETX ) 和鉴定和编码DETX的多核苷酸。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，本发明还提供了一种诊断，治疗或预防与DETX表达有关的疾病的方法。

表 1

SEQ ID NO.	ヌクレオチド配列 (5'から3'まで)	位置
1	3755566 (GCGGCGGCGG) 3755567 (GCGGCGGCGG) 3755568 (GCGGCGGCGG) 3755569 (GCGGCGGCGG) 3755570 (GCGGCGGCGG) 3755571 (GCGGCGGCGG) 3755572 (GCGGCGGCGG) 3755573 (GCGGCGGCGG) 3755574 (GCGGCGGCGG) 3755575 (GCGGCGGCGG) 3755576 (GCGGCGGCGG) 3755577 (GCGGCGGCGG) 3755578 (GCGGCGGCGG) 3755579 (GCGGCGGCGG) 3755580 (GCGGCGGCGG) 3755581 (GCGGCGGCGG) 3755582 (GCGGCGGCGG) 3755583 (GCGGCGGCGG) 3755584 (GCGGCGGCGG) 3755585 (GCGGCGGCGG) 3755586 (GCGGCGGCGG) 3755587 (GCGGCGGCGG) 3755588 (GCGGCGGCGG) 3755589 (GCGGCGGCGG) 3755590 (GCGGCGGCGG) 3755591 (GCGGCGGCGG) 3755592 (GCGGCGGCGG) 3755593 (GCGGCGGCGG) 3755594 (GCGGCGGCGG) 3755595 (GCGGCGGCGG) 3755596 (GCGGCGGCGG) 3755597 (GCGGCGGCGG) 3755598 (GCGGCGGCGG) 3755599 (GCGGCGGCGG) 3755600 (GCGGCGGCGG)	11455565 (GCGGCGGCGG) 11455566 (GCGGCGGCGG) 11455567 (GCGGCGGCGG) 11455568 (GCGGCGGCGG) 11455569 (GCGGCGGCGG) 11455570 (GCGGCGGCGG) 11455571 (GCGGCGGCGG) 11455572 (GCGGCGGCGG) 11455573 (GCGGCGGCGG) 11455574 (GCGGCGGCGG) 11455575 (GCGGCGGCGG) 11455576 (GCGGCGGCGG) 11455577 (GCGGCGGCGG) 11455578 (GCGGCGGCGG) 11455579 (GCGGCGGCGG) 11455580 (GCGGCGGCGG) 11455581 (GCGGCGGCGG) 11455582 (GCGGCGGCGG) 11455583 (GCGGCGGCGG) 11455584 (GCGGCGGCGG) 11455585 (GCGGCGGCGG) 11455586 (GCGGCGGCGG) 11455587 (GCGGCGGCGG) 11455588 (GCGGCGGCGG) 11455589 (GCGGCGGCGG) 11455590 (GCGGCGGCGG) 11455591 (GCGGCGGCGG) 11455592 (GCGGCGGCGG) 11455593 (GCGGCGGCGG) 11455594 (GCGGCGGCGG) 11455595 (GCGGCGGCGG) 11455596 (GCGGCGGCGG) 11455597 (GCGGCGGCGG) 11455598 (GCGGCGGCGG) 11455599 (GCGGCGGCGG) 11455600 (GCGGCGGCGG)
2	4469145 (GCGGCGGCGG) 4469146 (GCGGCGGCGG) 4469147 (GCGGCGGCGG) 4469148 (GCGGCGGCGG) 4469149 (GCGGCGGCGG) 4469150 (GCGGCGGCGG) 4469151 (GCGGCGGCGG) 4469152 (GCGGCGGCGG) 4469153 (GCGGCGGCGG) 4469154 (GCGGCGGCGG) 4469155 (GCGGCGGCGG) 4469156 (GCGGCGGCGG) 4469157 (GCGGCGGCGG) 4469158 (GCGGCGGCGG) 4469159 (GCGGCGGCGG) 4469160 (GCGGCGGCGG) 4469161 (GCGGCGGCGG) 4469162 (GCGGCGGCGG) 4469163 (GCGGCGGCGG) 4469164 (GCGGCGGCGG) 4469165 (GCGGCGGCGG) 4469166 (GCGGCGGCGG) 4469167 (GCGGCGGCGG) 4469168 (GCGGCGGCGG) 4469169 (GCGGCGGCGG) 4469170 (GCGGCGGCGG) 4469171 (GCGGCGGCGG) 4469172 (GCGGCGGCGG) 4469173 (GCGGCGGCGG) 4469174 (GCGGCGGCGG) 4469175 (GCGGCGGCGG) 4469176 (GCGGCGGCGG) 4469177 (GCGGCGGCGG) 4469178 (GCGGCGGCGG) 4469179 (GCGGCGGCGG) 4469180 (GCGGCGGCGG)	2079145 (GCGGCGGCGG) 2079146 (GCGGCGGCGG) 2079147 (GCGGCGGCGG) 2079148 (GCGGCGGCGG) 2079149 (GCGGCGGCGG) 2079150 (GCGGCGGCGG) 2079151 (GCGGCGGCGG) 2079152 (GCGGCGGCGG) 2079153 (GCGGCGGCGG) 2079154 (GCGGCGGCGG) 2079155 (GCGGCGGCGG) 2079156 (GCGGCGGCGG) 2079157 (GCGGCGGCGG) 2079158 (GCGGCGGCGG) 2079159 (GCGGCGGCGG) 2079160 (GCGGCGGCGG) 2079161 (GCGGCGGCGG) 2079162 (GCGGCGGCGG) 2079163 (GCGGCGGCGG) 2079164 (GCGGCGGCGG) 2079165 (GCGGCGGCGG) 2079166 (GCGGCGGCGG) 2079167 (GCGGCGGCGG) 2079168 (GCGGCGGCGG) 2079169 (GCGGCGGCGG) 2079170 (GCGGCGGCGG) 2079171 (GCGGCGGCGG) 2079172 (GCGGCGGCGG) 2079173 (GCGGCGGCGG) 2079174 (GCGGCGGCGG) 2079175 (GCGGCGGCGG) 2079176 (GCGGCGGCGG) 2079177 (GCGGCGGCGG) 2079178 (GCGGCGGCGG) 2079179 (GCGGCGGCGG) 2079180 (GCGGCGGCGG)