(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-222665
(P2017-222665A)
(43)公開日　平成29年12月21日(2017.12.21)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 38/16	(2006.01)	A61K	38/16	ZNA	4B050
A61K 9/107	(2006.01)	A61K	9/107		4C076
A61K 9/127	(2006.01)	A61K	9/127		4C084
A61K 38/43	(2006.01)	A61K	38/43		4C085
A61K 38/53	(2006.01)	A61K	38/53		

審査請求 有　請求項の数 16　ＯＬ　（全 253 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-127737 (P2017-127737)
(22)出願日　平成29年6月29日 (2017.6.29)
(62)分割の表示　特願2014-557848 (P2014-557848)の分割
原出願日　平成25年2月15日 (2013.2.15)
(31)優先権主張番号　61/599,802
(32)優先日　平成24年2月16日 (2012.2.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/655,358
(32)優先日　平成24年6月4日 (2012.6.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/725,414
(32)優先日　平成24年11月12日 (2012.11.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　512264080
エータイアー　ファーマ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２１２１，　サンディエゴ，　ジョン　ホプキンス　コート　３５４５，　スイート　ナンバー２５０
(71)出願人　511225594
パング　バイオファーマ　リミテッド
中華人民共和国　香港　クイーンズ　ロード　セントラル　１５，　ザ　ランドマーク，　エジンバラ　タワー，　１８／エフ
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】自己免疫および炎症疾患を処置するためのヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素

(57)【要約】　（修正有）
【課題】Ｊｏ－１抗体に関連するものを含めた自己免疫疾患および他の炎症疾患を処置するためのヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素ポリペプチドまたは他の特定の遮断剤を含む組成物および方法の提供。
【解決手段】特定のアミノ酸配列と９０％以上が同一であり、他のアミノ酸配列の残基５０７～５０９を欠く、長さが５００～５０６アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドをコードする修飾されたｍＲＮＡポリヌクレオチドを含む組成物であって、実質的にエンドトキシンを含まない、組成物。
【選択図】図１

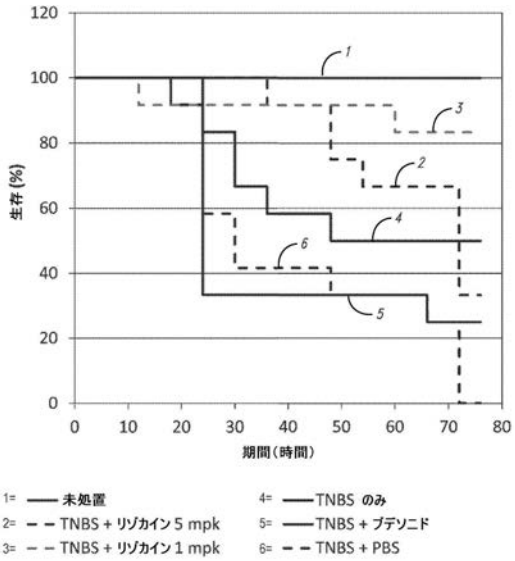


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが約２０～９０アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成物／ＨＲＳポリペプチドは、
ａ）少なくとも約９５％純粋であり、
ｂ）約５％未満凝集しており、
ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物。
【請求項２】
前記ＨＲＳポリペプチドの少なくとも２０アミノ酸が、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記ＨＲＳポリペプチドの少なくとも４０アミノ酸が、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記ＨＲＳポリペプチドの少なくとも６０アミノ酸が、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する、請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
配列番号１と少なくとも９０％同一である８０以上の連続したアミノ酸を含む、長さが少なくとも約４００アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成物／ＨＲＳポリペプチドは、
ａ）少なくとも約９５％純粋であり、
ｂ）約５％未満凝集しており、
ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物。
【請求項６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１と少なくとも９０％同一である２００以上のアミノ酸を含む、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１と少なくとも９０％同一である４００以上のアミノ酸を含む、請求項５に記載の組成物。
【請求項８】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが少なくとも約５００アミノ酸である、請求項５に記載の組成物。
【請求項９】
前記ＨＲＳポリペプチドが、全長ヒトＨＲＳ（配列番号１）の配列を含む、請求項５に記載の組成物。
【請求項１０】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基５０５でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０５））かまたは配列番号１の残基５０６でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０６））、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのシステイン残基の変異を有する、請求項５に記載の組成物。
【請求項１２】
前記システイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される、請求項１１に記載の組成物。
【請求項１３】
配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが少なくとも約４００アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成

物／ＨＲＳポリペプチドは、
ａ）少なくとも約９５％純粋であり、
ｂ）約５％未満凝集しており、
ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物。
【請求項１４】
配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが少なくとも約５００アミノ酸のＨＲＳポリペプチドを含む、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ヒトＨＲＳ）の配列を含む、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基５０５でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０５））かまたは配列番号１の残基５０６でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０６））、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのシステイン残基の変異を有する、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１８】
前記システイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される、請求項１７に記載の組成物。
【請求項１９】
配列番号７０（ＨＲＳ（１～５０６））と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く、長さが５００～５０６アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成物／ＨＲＳポリペプチドは、
ａ）少なくとも約９５％純粋であり、
ｂ）約５％未満凝集しており、
ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物。
【請求項２０】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが５０５～５０６アミノ酸であり、配列番号７０と少なくとも９０％同一である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが５０６アミノ酸である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０を含む、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２３】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０から本質的になる、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２４】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０からなる、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２５】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが５０５アミノ酸である、請求項１９に記載の組成物。
【請求項２６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））を含む、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））

から本質的になる、請求項２６に記載の組成物。
【請求項２８】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））からなる、請求項２７に記載の組成物。
【請求項２９】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのシステイン残基の変異を有する、請求項１９に記載の組成物。
【請求項３０】
前記少なくとも１つのシステイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、およびＣｙｓ４５５から選択される、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、約４～４０℃、および約６．０～８．０のｐＨの範囲の同等の条件下で、配列番号１（全長ヒトＨＲＳ）のポリペプチドと比べて、生物活性、安定性、および／または均一性が増大している、請求項１９から３０のいずれかに記載の組成物。
【請求項３２】
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約２０～２５℃（室温）の温度、および約７．０～７．５のｐＨを含む、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３３】
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約３７℃の温度、および約７．０～７．５のｐＨを含む、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３４】
活性の増大が、少なくとも約１０％の非カノニカル生物活性の絶対的増大を含む、請求項３１から３３のいずれかに記載の組成物。
【請求項３５】
前記非カノニカル活性が、抗炎症活性、または抗Ｊｏ－１抗体への特異的結合である、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ＨＲＳ）の前記ポリペプチドと比べて、還元条件下での鎖間ジスルフィド形成が低減されている、請求項３１から３３のいずれかに記載の組成物。
【請求項３７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ＨＲＳ）の前記ポリペプチドと比べて、電荷不均一性が低減している、請求項３１から３３のいずれかに記載の組成物。
【請求項３８】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ＨＲＳ）の前記ポリペプチドと比べて、溶液中での高分子量凝集体の形成が低減されている、請求項３１から３３のいずれかに記載の組成物。
【請求項３９】
均一性の増大が、配列番号１の前記ポリペプチドと比べて、前記ＨＲＳポリペプチドの単分散の少なくとも１０％の増大を含む、請求項３１から３３のいずれかに記載の組成物。
【請求項４０】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ＨＲＳ）の前記ポリペプチドと比べて、Ｅ．ｃｏｌｉ中で組換え産生される際の可溶性タンパク質の収率が増大している、請求項１９から３９のいずれかに記載の組成物。
【請求項４１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、異種融合パートナー、必要に応じてＴ細胞リガンドに融合されている、請求項１から４０のいずれかに記載の組成物。

【請求項４２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのＤ－アミノ酸を含む、請求項１から４０のいずれかに記載の組成物。
【請求項４３】
約０．０３ｍＭ～約１００ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む、請求項１から４２のいずれかに記載の組成物。
【請求項４４】
約２ｍＭ～約５０ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４５】
約４０ｍＭ～約６０ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４６】
約４５ｍＭ～約５５ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４７】
約５０ｍＭの濃度で緩衝剤を含む、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４８】
前記緩衝剤が、ヒスチジン緩衝剤、クエン酸緩衝剤、またはリン酸緩衝剤である、請求項４３から４７のいずれかに記載の組成物。
【請求項４９】
前記緩衝剤がヒスチジン緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、約４～４０℃、および約７．０～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、該ヒスチジン緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５０】
前記緩衝剤がクエン酸緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、約４～４０℃、および約６．５～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、該クエン酸緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５１】
前記緩衝剤がリン酸緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、約４～４０℃、および約７．０～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、該リン酸緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５２】
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約５℃の温度を含む、請求項４９から５１のいずれかに記載の組成物。
【請求項５３】
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約２０～２５℃（室温）の温度を含む、請求項４９から５１のいずれかに記載の組成物。
【請求項５４】
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約３７℃の温度を含む、請求項４９から５１のいずれかに記載の組成物。
【請求項５５】
安定性の増大が熱安定性を含み、前記ＨＲＳポリペプチドの融解温度（Ｔｍ）が、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の前記組成物中の前記対応するＨＲＳポリペプチドのものより少なくとも約５℃高い、請求項４９から５４のいずれかに記載の組成物。
【請求項５６】
安定性の増大が熱安定性を含み、前記ＨＲＳポリペプチドの融解温度が、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の前記組成物中の前記対応するＨＲＳポリペプチ

ドのものより少なくとも約１０％遅い速度でアンフォールドさせる、請求項４９から５４のいずれかに記載の組成物。
【請求項５７】
その他は同等の条件下で、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の組成物と比べて、凝集および／または沈降が低減している、請求項４９から５６のいずれかに記載の組成物。
【請求項５８】
凝集が、Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、少なくとも約１０％低減されている、請求項５７に記載の組成物。
【請求項５９】
その他は同等の条件下で、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の組成物と比べて、高分子量凝集体が低減している、請求項４９から５８のいずれかに記載の組成物。
【請求項６０】
前記緩衝剤がヒスチジン緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く、請求項５５から５９のいずれかに記載の組成物。
【請求項６１】
前記緩衝剤がクエン酸緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く、請求項５５から５９のいずれかに記載の組成物。
【請求項６２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）である、請求項６０または６１に記載の組成物。
【請求項６３】
約１００～３００ｍＭの範囲の濃度で、必要に応じて約１４０ｍＭで、塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を含む、請求項１から６２のいずれかに記載の組成物。
【請求項６４】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠き、必要に応じて、少なくとも約６０℃の融解温度（Ｔｍ）を有する、請求項６３に記載の組成物。
【請求項６５】
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）であり、必要に応じて、少なくとも約６０℃の融解温度（Ｔｍ）を有する、請求項６４に記載の組成物。
【請求項６６】
１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤を含む、請求項１から６５のいずれかに記載の組成物。
【請求項６７】
前記１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤が、スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、アルギニン、グリシン、およびグリセロールから選択される、請求項６６に記載の組成物。
【請求項６８】
前記１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤が、約０．２～５．０％の範囲の濃度である、請求項６６または６７に記載の組成物。
【請求項６９】
前記薬学的に許容される賦形剤が、約１～３％のスクロース、必要に応じて約２％のスクロースである、請求項６８に記載の組成物。
【請求項７０】
前記薬学的に許容される賦形剤が、約１～３％のトレハロース、必要に応じて約２％の

トレハロースである、請求項６８に記載の組成物。
【請求項７１】
１種または複数種の界面活性剤を含む、請求項１から７０のいずれかに記載の組成物。
【請求項７２】
前記界面活性剤が、ポリソルベートまたはポロキサマーである、請求項７１に記載の組成物。
【請求項７３】
前記ポリソルベートが、ポリソルベート２０（ＰＳ２０）、ポリソルベート４０（ＰＳ４０）、ポリソルベート６０（ＰＳ６０）、またはポリソルベート８０（ＰＳ８０）である、請求項７２に記載の組成物。
【請求項７４】
前記ポリソルベートがＰＳ２０である、請求項７３に記載の組成物。
【請求項７５】
前記ポロキサマーがプルロニックＦ６８である、請求項７２に記載の組成物。
【請求項７６】
前記界面活性剤が、約０．１～５．０％（ｗ／ｖ）の範囲で存在する、請求項７１から７４のいずれかに記載の組成物。
【請求項７７】
前記界面活性剤が、約０．０５％（ｗ／ｖ）のＰＳ２０である、請求項７６に記載の組成物。
【請求項７８】
抗酸化化合物を含む、請求項１から７４のいずれかに記載の組成物。
【請求項７９】
前記抗酸化化合物が、システイン、メチオニン、およびＮ－アセチルシステイン（ＮＡＣ）から選択される、請求項７８に記載の組成物。
【請求項８０】
前記抗酸化化合物が、約０．１～５．０ｍＭの濃度範囲で存在する、請求項７８または７９に記載の組成物。
【請求項８１】
キレート化剤を含む、請求項１から８０のいずれかに記載の組成物。
【請求項８２】
前記キレート化剤がエチレンジアミンテトラアセテート（ＥＤＴＡ）である、請求項８１に記載の組成物。
【請求項８３】
前記キレート化剤が、約０．１～２．０ｍＭの濃度範囲で存在する、請求項８１または８２に記載の組成物。
【請求項８４】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約１０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する、請求項１から８３のいずれかに記載の組成物。
【請求項８５】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約２５ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する、請求項１から８３のいずれかに記載の組成物。
【請求項８６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約５０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する、請求項１から８３のいずれかに記載の組成物。
【請求項８７】
Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、約０．５未満の濁度を有する、請求項１から８６のいずれかに記載の組成物。
【請求項８８】
Ａ３４０での吸光度が、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間

インキュベートした後に測定される、請求項８７に記載の組成物。
【請求項８９】
Ａ３４０での吸光度が、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、請求項８７に記載の組成物。
【請求項９０】
Ａ３４０での吸光度が、少なくとも１、２、３、４、または５回、前記組成物を凍結融解した後に測定される、請求項８７に記載の組成物。
【請求項９１】
Ａ５８０での吸光度によって測定した場合、約０．６未満の不透明度を有する、請求項１から８６のいずれかに記載の組成物。
【請求項９２】
Ａ５８０での吸光度が、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、請求項９１に記載の組成物。
【請求項９３】
Ａ５８０での吸光度が、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、請求項９１に記載の組成物。
【請求項９４】
Ａ５８０での吸光度が、少なくとも１、２、３、４、または５回、前記組成物を凍結融解した後に測定される、請求項９１に記載の組成物。
【請求項９５】
約３％未満の高分子量凝集体を有する、請求項１から９４のいずれかに記載の組成物。
【請求項９６】
高分子量（ＨＭＷ）凝集が、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、請求項９５に記載の組成物。
【請求項９７】
高分子量（ＨＭＷ）凝集が、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、請求項９５に記載の組成物。
【請求項９８】
高分子量凝集が、少なくとも１、２、３、４、または５回、前記組成物を凍結融解した後に測定される、請求項９５に記載の組成物。
【請求項９９】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約５０℃の前記組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する、請求項１から９８のいずれかに記載の組成物。
【請求項１００】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約５５℃の前記組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する、請求項９９に記載の組成物。
【請求項１０１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約６０℃の前記組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する、請求項１００に記載の組成物。
【請求項１０２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約９０％単分散である、請求項１～１０１のいずれかに記載の組成物。
【請求項１０３】
約５０ｍＭのＬ－ヒスチジン、約１４０ｍＭのＮａＣｌ、約２％のトレハロース、約０．０５％のポリソルベート２０（ＰＳ２０）を含み、約７．０～７．４のｐＨを有する、請求項１～１０２のいずれかに記載の組成物。
【請求項１０４】
約５０ｍＭのＬ－ヒスチジン、約１４０ｍＭのＮａＣｌ、約２％のスクロース、約０．０５％のポリソルベート２０（ＰＳ２０）を含み、約７．０～７．４のｐＨを有する、請求項１～１０２のいずれかに記載の組成物。

【請求項１０５】
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）であり、少なくとも約６０℃の前記組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する、請求項１０３または１０４に記載の組成物。
【請求項１０６】
Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、約０．１未満、または約０．０５未満の濁度を有する、請求項１０５に記載の組成物。
【請求項１０７】
Ａ５８０での吸光度によって測定した場合、約０．１未満、または約０．０５未満の不透明度を有する、請求項１０５に記載の組成物。
【請求項１０８】
約２％未満または約１％未満の高分子量凝集体を有する、請求項１０５に記載の組成物。
【請求項１０９】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、該ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１つのカノニカルまたは非カノニカル機能に取って代わることができる、治療用組成物。
【請求項１１０】
前記ＨＲＳポリペプチドが、最大約5×10^{-7}Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない、請求項１０９に記載の治療用組成物。
【請求項１１１】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、該自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、寛容化を引き起こすことができる、治療用組成物。
【請求項１１２】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、哺乳動物ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸を含み、該ＨＲＳポリペプチドは、該自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該核酸は、発現コントロール配列に作動可能にカップリングしており、該核酸が発現されると寛容化が引き起こされる、治療用組成物。
【請求項１１３】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、組換え宿主細胞を含み、該宿主細胞は、該自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含む少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現し、該核酸は、該宿主細胞内で該ＨＲＳの発現を可能にするように発現コントロール配列に作動可能にカップリングしている、治療用組成物。
【請求項１１４】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、該自己抗体に特異的な抗体または結合タンパク質を含み、該抗体または結合タンパク質は、天然ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への該自己抗体の結合を遮断する、治療用組成物。
【請求項１１５】
少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、炎症疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、該ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物。
【請求項１１６】
少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、筋ジストロフィーの処置において使用す

るための治療用組成物であって、該ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物。
【請求項１１７】
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、および先天型筋ジストロフィーから選択される、請求項１１６に記載の治療用組成物。
【請求項１１８】
少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、横紋筋融解症、筋肉の消耗、悪液質、筋肉炎症、または筋傷害の処置において使用するための治療用組成物であって、該ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物。
【請求項１１９】
自己免疫疾患または炎症疾患を処置するための医薬の調製におけるヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドの使用。
【請求項１２０】
前記治療用組成物またはＨＲＳポリペプチドが、請求項１から１０８のいずれかのように定義されている、請求項１０９～１１８のいずれかに記載の治療用組成物または請求項１１９に記載の使用。
【請求項１２１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約１０～約６０アミノ酸である、請求項１０９～１１８のいずれかに記載の治療用組成物または請求項１１９に記載の使用。
【請求項１２２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約６０～約８０アミノ酸である、請求項１０９～１１８のいずれかに記載の治療用組成物または請求項１１９に記載の使用。
【請求項１２３】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約８０～約２００アミノ酸である、請求項１０９～１１８のいずれかに記載の治療用組成物または請求項１１９に記載の使用。
【請求項１２４】
前記ＨＲＳポリペプチドが全長である、請求項１０９～１１８のいずれかに記載の治療用組成物または請求項１１９に記載の使用。
【請求項１２５】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基５０５または５０６でトランケートされている、請求項１０９～１１８のいずれかに記載の治療用組成物または請求項１１９に記載の使用。
【請求項１２６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、システイン残基で少なくとも１つの変異を有する、請求項１０９～１１８のいずれかに記載の治療用組成物または請求項１１９に記載の使用。
【請求項１２７】
前記システイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される、請求項１２６に記載の治療用組成物。
【請求項１２８】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのＤアミノ酸を含む、前記請求項のいずれかに記載の治療用組成物または使用。
【請求項１２９】
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＷＨＥＰドメインを含むかまたはそれから本質的になる、前記請求項のいずれかに記載の治療用組成物または使用。
【請求項１３０】
前記ＨＲＳポリペプチドが、

ａ）配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列、または
ｂ）表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列
を含む、前記請求項のいずれかに記載の治療用組成物または使用。
【請求項１３１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、異種タンパク質に融合されている、前記請求項のいずれかに記載の治療用組成物または使用。
【請求項１３２】
前記異種タンパク質がＴ細胞リガンドを含む、請求項１３１に記載の治療用組成物または使用。
【請求項１３３】
自己抗体に関連した疾患を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞、またはｄ）該自己抗体に特異的な抗体もしくは結合タンパク質
のうちの１種または複数を含む治療用組成物を投与するステップを含む、方法。
【請求項１３４】
前記治療用組成物が、疾患症状が出現する前に、前記被験体に投与される、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３５】
前記自己抗体が、ヒトヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的である、請求項１３３または１３４に記載の方法。
【請求項１３６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、前記疾患特異的自己抗体によって認識される前記ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１種のエピトープを含む、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１３７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、前記自己抗体の天然ヒトヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への結合を遮断する、請求項１３６に記載の方法。
【請求項１３８】
前記ＨＲＳポリペプチドが、自己反応性Ｔ細胞のクローン除去を引き起こす、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１３９】
前記ＨＲＳポリペプチドが、自己免疫応答に関与するＴ細胞の機能的不活化を引き起こす、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１４０】
前記ＨＲＳポリペプチドが、筋肉炎症または肺炎症の低減をもたらす、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１４１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、寛容を誘導する、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１４２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約１０～約６０アミノ酸である、請求項１３３から１４１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４３】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約４０～約８０アミノ酸である、請求項１３３から１４１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４４】

前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約８０～約２００アミノ酸である、請求項１３３から１４１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４５】
前記ＨＲＳポリペプチドが全長である、請求項１３３から１４１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、残基５０５または５０６でトランケートされている、請求項１３３から１４１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、システイン残基で少なくとも１つの変異を有する、請求項１３３から１４１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４８】
前記システイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される、請求項１４７に記載の方法。
【請求項１４９】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのＤ－アミノ酸を含む、請求項１３３から１４８のいずれかに記載の方法。
【請求項１５０】
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＷＨＥＰドメインを含むかまたはそれから本質的になる、請求項１３３から１４９のいずれかに記載の方法。
【請求項１５１】
前記ＨＲＳポリペプチドが、
ａ）配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列、または
ｂ）表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列
を含む、請求項１３３から１５０のいずれかに記載の方法。
【請求項１５２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、異種タンパク質に融合されている、請求項１３３から１５１のいずれかに記載の方法。
【請求項１５３】
前記異種タンパク質がＴ細胞リガンドを含む、請求項１５２に記載の方法。
【請求項１５４】
前記組成物が、経口、鼻腔内、経肺、筋肉内または非経口投与を介する送達のために製剤化される、請求項１３３から１５３のいずれかに記載の方法。
【請求項１５５】
前記疾患が、炎症性筋疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、および関連障害を含めた炎症性筋疾患、多発性筋炎－強皮症オーバーラップ、封入体筋炎（ＩＢＭ）、抗合成酵素症候群、間質性肺疾患、関節炎、ならびにレイノー現象からなる群から選択される、請求項１３３から１５４のいずれかに記載の方法。
【請求項１５６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、前記被験体に由来する血清中の抗体によって認識される少なくとも１種の免疫優性エピトープを含む、請求項１３３から１５５のいずれかに記載の方法。
【請求項１５７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、ヒト組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩ分子に結合する、請求項１３３から１５６のいずれかに記載の方法。
【請求項１５８】

前記核酸が、発現コントロール配列に作動可能にカップリングしており、前記核酸が発現されると寛容化が引き起こされる、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１５９】
前記治療用組成物が、リポソーム、ミセル、エマルジョン、および細胞からなる群から選択される送達ビヒクルを含む、請求項１３３に記載の方法。
【請求項１６０】
組織炎症を低減する方法であって、それを必要とする被験体に、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法。
【請求項１６１】
前記組織が、筋肉、肺、および皮膚から選択される、請求項１６０に記載の方法。
【請求項１６２】
筋肉炎症または肺炎症を低減する方法であって、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含む、方法。
【請求項１６３】
筋ジストロフィーを処置する方法であって、それを必要とする被験体に、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法。
【請求項１６４】
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、および先天型筋ジストロフィーから選択される、請求項１６３に記載の方法。
【請求項１６５】
横紋筋融解症、筋肉の消耗、悪液質、筋肉炎症、または筋傷害を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法。
【請求項１６６】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する寛容を誘導する方法であって、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該組成物を投与すると、該自己抗原に対する寛容化が引き起こされる、方法。
【請求項１６７】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する自己免疫応答に関与するＴ細胞のセットまたはサブセットを排除するための方法であって、

ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該組成物を投与すると、自己反応性Ｔ細胞のクローン除去が引き起こされる、方法。
【請求項１６８】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する自己免疫応答に関与するＴ細胞内でアネルギーを誘導するための方法であって、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該組成物を投与すると、該自己免疫応答に関与する該Ｔ細胞の機能的不活化が引き起こされる、方法。
【請求項１６９】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患を処置するための補充療法であって、それを必要とする被験体に、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞、またはｄ）自己抗体に特異的な抗体もしくは結合タンパク質
のうちの１種または複数を含む治療用組成物を投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足を機能的に補償する、補充療法。
【請求項１７０】
自己免疫疾患または炎症疾患を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む治療用組成物を投与するステップを含む、方法。
【請求項１７１】
前記ＨＲＳタンパク質が、最大約５×１０$^{-7}$Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約１０～約６０アミノ酸である、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７３】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約６０～約８０アミノ酸である、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７４】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約８０～約２００アミノ酸である、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７５】
前記ＨＲＳポリペプチドが全長である、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのＤアミノ酸を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＷＨＥＰドメインを含むかまたはそれから本質的になる、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項１７８】
前記ＨＲＳポリペプチドが、
ａ）配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列、または
ｂ）表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列
を含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１７９】
前記ＨＲＳポリペプチドが、異種タンパク質に融合されている、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１８０】
前記異種タンパク質が、免疫認識ドメイン、または免疫共刺激ドメインを含む、請求項１７９に記載の方法。
【請求項１８１】
前記組成物が、経口、鼻腔内、経肺、筋肉内または非経口投与を介する送達のために製剤化される、前記請求項のいずれかに記載の方法。
【請求項１８２】
試料中のＨＲＳポリペプチドまたはその断片の存在またはレベルを判定する方法であって、該試料を、該ＨＲＳポリペプチドに特異的に結合する１種または複数種の結合剤と接触させるステップと、該結合剤の存在または非存在を検出し、それによって該ＨＲＳポリペプチドの存在またはレベルを判定するステップとを含む、方法。
【請求項１８３】
特定のＨＲＳポリペプチドに対する抗ＨＲＳポリペプチド抗体のエピトープ特異性を判定する方法であって、該抗体を１種または複数種のＨＲＳポリペプチドと接触させるステップと、抗体結合の存在または非存在を検出し、それによって該抗体の該エピトープ特異性を判定するステップとを含む、方法。
【請求項１８４】
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む治療用組成物を投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、最大約1×10^{-7}Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない、方法。
【請求項１８５】
ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を有するリスクのあるヒト被験体を同定するための方法であって、
ａ）該被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、
ｂ）該被験体がヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素または該ＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして該被験体を同定するステップと
を含む、方法。
【請求項１８６】
前記被験体の血清中のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度が約２マイクロモル濃度より高い場合、該被験体が、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして同定される、請求項１８５に記載の方法。
【請求項１８７】
前記被験体の血清中のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度が約２マイクロモル濃度より高い場合、該被験体が、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして同定される、請求項１８５に記載の方法。

【請求項１８８】
細胞外体液から抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）抗体を体外免疫吸着させるための方法であって、
（ａ）被験体から得られた該細胞外体液を準備するステップと、
（ｂ）該細胞外体液を、少なくとも１種のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素ポリペプチドが付着した生体適合性固体支持体と接触させ、それによって該固体支持体上に該抗ＨＲＳ抗体を捕捉するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）からの該細胞外体液を該被験体中に再注入するステップとを含む、方法。
【請求項１８９】
前記抗ＨＲＳ抗体がＪｏ－１抗体を含む、請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９０】
自己免疫状態または炎症状態を有するヒト被験体を処置するためのＨＲＳポリペプチドを選択するための方法であって、
ａ）該被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、
ｂ）野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素と比較して該抗ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体に対する親和性が低減しているＨＲＳポリペプチドを選択するステップと
を含む、方法。
【請求項１９１】
ヒト被験体の疾患進行を予後判定するための方法であって、
ａ）該被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、
ｂ）該被験体が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素またはＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、より重篤な疾患を生じさせるリスクがあるとして該被験体を同定するステップと
を含む、方法。
【請求項１９２】
ＨＲＳポリペプチド投与に対する被験体の応答を予測するための方法であって、ａ）該被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、
ｂ）該被験体が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素または該ＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして該被験体を同定するステップと
を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、２０１２年１１月１２日に出願された米国出願第６１／７２５，４１４号、２０１２年６月４日に出願された米国出願第６１／６５５，３５８号および２０１２年２月１６日に出願された米国出願第６１／５９９，８０２号の米国特許法第１１９条（ｅ）項の下での利益を主張するものであり、上記各出願はその全体が参考として援用される。
【０００２】
配列表に関する記述
本願に関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキストフォーマットで提供され、ここにおいて参照により本明細書に組み込まれる。配列表を掲載しているテキストファイル名はＡＴＹＲ＿１１０＿０３ＷＯ＿ＳＴ２５．ｔｘｔである。このテキストファイルは約２５８ＫＢであり、２０１３年２月１５日に作成され、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子的に提出されている。

【０００３】
本発明の実施形態は一般に、特性が改善されたヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素ポリペプチド、ＨＲＳポリペプチドを含む組成物、ならびに抗Ｊｏ－１抗体関連炎症疾患および自己免疫疾患を処置する方法を含めた、様々な炎症疾患および自己免疫疾患を処置するためにＨＲＳポリペプチドまたは組成物を使用する関連方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
フィシオクリン（physiocrine）は一般に、高等生物のアミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＡＡＲＳ）遺伝子ファミリーに見つかる小さな天然に存在するタンパク質ドメインであり、タンパク質合成におけるアミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素の十分に確立された役割に必要とされない。フィシオクリンパラダイムが発見されるまで、約２０酵素のファミリーであるアミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素は、すべての生細胞内でのこれらの遍在的な発現、およびタンパク質合成のプロセスにおけるこれらの本質的な役割についてのみ公知であった。しかし現在、より最近の科学的知見により、アミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素は、タンパク質合成を越える追加の役割を持ち、実際に、組織生理機能および疾患における重要な恒常的な役割を果たすように多細胞生物において進化していることが示唆されている。
【０００５】
ＡＡＲＳの非カノニカル機能の存在の証拠としては、単純な単細胞生物からより複雑な生命体への進化の間に、ＡＡＲＳが、タンパク質合成を促進する能力を失うことなく、追加のドメインの付加によってより構造的に複雑になるように進化したことを立証する規定された配列比較がある。
【０００６】
この仮説と一致して、ＡＡＲＳの拡張された機能の豊かで多様なセットが高等真核生物において、特に、ヒトｔＲＮＡ合成酵素について見つかっている。このデータは、個々のドメインの直接分析、および疾患に必然的に関連するが、アミノアシル化またはタンパク質合成活性に影響しないｔＲＮＡ合成酵素の遺伝子中の変異の発見の両方に基づき、これらの新しく追加されるドメインまたはフィシオクリンが、ＡＡＲＳの新しく獲得された非カノニカル機能の中核を成すことを示唆する。
【０００７】
さらに、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＡＲＳ、ＨＲＳ、またはＨｉｓＲＳ）などの特定のｔＲＮＡ合成酵素は、生細胞から放出または分泌され得、とりわけ、免疫調節性、走化性、および血管新生の性質を有する重要な局所的に作用するシグナルをもたらし得るという認識が現在増大している。細胞外シグナル伝達分子としてのＡＡＲＳの役割の直接の確認は、特定のｔＲＮＡ合成酵素の分泌および細胞外放出を示す研究、ならびに新しく追加されたドメイン（フィシオクリン）を含むｔＲＮＡ合成酵素の断片であるが、これらのドメインを欠く他の断片ではない断片の付加は、一連の細胞外シグナル伝達経路において活性であるという直接の実証により得られた。ＨＲＳに由来するものを含めたこれらのフィシオクリンは、ヒト疾患を処置するための新しいクラス初の治療用タンパク質を開発する新しい、以前に手掛けられていない機会を意味する。
【０００８】
最近の研究により、いくつかのｔＲＮＡ合成酵素は、細胞型特異的発現の増大、または特定の組織中で、もしくは特定の疾患との関連で特定のｔＲＮＡ合成酵素の代替スプライシングをもたらす、ＡＬＵエレメント（Rudinger-Thirionら、PNAS USA、１０８巻（４０号）：Ｅ７９４～Ｅ８０２頁、２０１１年）を含めた新規制御遺伝子エレメントを含むことも立証された。さらに、いくつかのフィシオクリンは、細胞型特異的様式で特別の刺激に応答してタンパク質分解的に産生される。フィシオクリンの細胞型特異的過剰発現および細胞外放出と一致して、いくつかの自己免疫疾患（一般に、抗合成酵素症候群（ant-synthetase syndrome）と呼ばれる）は、ｔＲＮＡ合成酵素の規定された群に対する抗体の産生と関連する（Tzioufas Orphanet（２００１年）１～５頁；Parkら、Rheumatol.

Int.、３１巻：５２９～５３２頁、２０１１年）。

【０００９】

自己免疫障害は、免疫系がその自己の組織に対して反応するとき生じる。自己免疫疾患は、単一の臓器もしくは組織が関与しているか否か、または複数の臓器もしくは組織が関与しているか否かに基づいて分類されることが多い。複数の臓器および組織の関与によって特徴付けられる、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）などの全般性または全身性自己免疫疾患は、基本的な細胞成分に対する自己抗体の存在に関連していることが多い。他の自己免疫疾患は、単一の臓器または組織に関連する抗原に対する自己抗体によって特徴付けられる。

【００１０】

全身性自己免疫疾患は一般に、自己抗体の存在によって特徴付けられる。特定の疾患に関連する自己抗体のいくつかは、疾患特異的であり得、他の自己抗体は、多くの自己免疫疾患に一般的であり得る。例えば、原型的な免疫不全であるＳＬＥは、他の自己免疫疾患において検出可能である自己抗体、例えば、抗単鎖ＤＮＡ抗体、抗ヒストン抗体、および抗リボ核粒子（ＲＮＰ）抗体などの存在、ならびにまた抗二本鎖ＤＮＡ抗体などのＳＬＥ特異的である自己抗体の存在によって特徴付けられる。他の全身性自己免疫障害、例えば、関節リウマチおよび（特発性）炎症性筋疾患なども、基本的な核および細胞質の細胞内成分と反応する患者の血清中の自己抗体の存在によって特徴付けられる。ＳＬＥと同様に、これらの自己抗体のいくつかは、他の自己免疫障害と関連し、いくつかは、自己免疫性筋炎と特に関連する。

【００１１】

（特発性）炎症性筋疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、および多発性筋炎－強皮症オーバーラップなどの関連障害は、慢性筋肉炎症および近位筋力低下によって特徴付けられる炎症性筋疾患である。筋肉炎症は、Plotzら、Annals of Internal Med.、１１１巻：１４３～１５７頁、１９８９年；ならびにWallaceら、J. Musculoskelat Med.、２７巻（１２号）４７０～４７９頁、２０１０年によって記載されているように、筋圧痛、筋力低下、ならびに最終的に筋萎縮および線維症を引き起こす。アルドラーゼ、クレアチンキナーゼ、トランスアミナーゼ（アラニンアミノトランスフェラーゼおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼなど）、ならびに乳酸脱水素酵素の血清レベルの上昇も、筋肉炎症と関連している。筋肉に加えて他のシステムも、これらの状態によって影響され得、関節炎、レイノー現象、および間質性肺疾患をもたらす。臨床的に、多発性筋炎と皮膚筋炎は、皮膚筋炎を有する患者における特徴的な発疹の存在によって区別される。これらの状態の筋炎の差異は、筋肉の病理のいくつかの試験において区別され得る。

【００１２】

間質性肺疾患（ＩＬＤ）は、線維症および炎症が、肺胞壁内、または気管支血管周囲鞘（peribronchovascular sheath）、小葉間中隔、および臓側胸膜を囲繞する緩い組織内で起こる障害の異種の群を含む。例えば、過敏性肺炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、チャーグ－ストラウス症候群、ウェジナー肉芽腫症、およびグッドパスチャー症候群を含めた、筋炎に加えて様々な自己免疫疾患を含むかまたはこれらと関連する異なる形態のＩＬＤが公知である。

【００１３】

炎症性筋肉疾患（ＩＭＤ）および間質性肺疾患（ＩＬＤ）は、重篤な慢性の潜在的に生命を危うくする自己免疫疾患であり、これに対する現在のスタンダードオブケアとしては、重要な副作用の潜在性を伴う、コルチコステロイドなどの非特異的抗炎症薬がある。これらの疾患の発症の原因は、まだ立証されていないが、ReichlinおよびArnett、Arthritis and Rheum.、２７巻：１１５０～１１５６頁、１９８４年によれば、多発性筋炎および皮膚筋炎を有する患者の約９０％において自己抗体を検出することができる。これらの患者の約６０％に由来する血清は、オクタロニー免疫拡散（ＩＤ）でウシ胸腺またはヒト脾臓抽出物と沈降物を形成し、一方、これらの患者の約８０％に由来する血清は、間接免疫蛍光法（ＩＩＦ）によって、ＨＥｐ－２細胞などの組織培養基質を染色する（Targoff

およびReichlin、Arthritis and Rheum.、２８巻：７９６～８０３頁、１９８５年；NishikaiおよびReichlin、Arthritis and Rheum.、２３巻：８８１～８８８頁、１９８０年；ならびにReichlinら、J. Clin. Immunol.、４巻：４０～４４頁、１９８４年）。筋炎患者において多数の沈降性自己抗体特異性が存在するが、各個々の抗体特異性は、患者の一部のみで起こる。

【００１４】

筋炎または筋炎オーバーラップ症候群に関連した多くの自己抗体が定義されており、いくつかの場合では、抗体は、同定されている（米国特許第６，６１０，８２３号、Antigens associated with polymyositis and with dermatomyositisを参照）。これらとしては、他の障害において存在する抗体、ならびにまたTargoffおよびReichlin、Mt. Sinai J. of Med.、５５巻：４８７～４９３頁、１９８８年に記載された疾患特異的抗体がある。

【００１５】

例えば、ｔＲＮＡおよびタンパク質合成に関連した細胞質タンパク質、特にアミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素に向けられる筋炎関連自己抗体の群が同定された。これらとしては、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対して向けられ、筋炎自己免疫障害に関連する最も一般的な自己抗体である（NishikaiおよびReichlin、Arthritis Rheum.、２３巻：８８１～８８８頁、１９８０年によれば、このような患者の約２０～４０％）抗Ｊｏ－１、トレオニル－ｔＲＮＡ合成酵素に対して向けられる抗ＰＬ－７、アラニル－ｔＲＮＡ合成酵素に対して向けられる抗ＰＬ－１２、イソロイシル－ｔＲＮＡ合成酵素に対して向けられる抗ＯＪ、グリシル－ｔＲＮＡ合成酵素に対して向けられる抗ＥＪ、アスパラギニル（asparginyl）－ｔＲＮＡ合成酵素（一般に、Targoff、Curr. Opin. Rheumatol.、１２巻、４７５～４８１頁、２０００年を参照）およびフェニルアラニン－ｔＲＮＡ合成酵素（Betteridgeら、Rheumat.、４６巻、１００５～１００８頁、２００７年）に対して向けられる抗ＫＳがある。フィーチャの特性基は、抗合成酵素に関連していることが多い（Loveら、Medicine.、７０巻：３６０～３７４頁、１９９１年）。

【００１６】

ＳＬＥを有する患者において頻繁に見つかる抗Ｕ１ ＲＮＰは、混合性結合組織病、筋炎を伴うオーバーラップ症候群において、または筋炎単独のいくつかの場合においても見つかる場合がある。この抗体は、ｍＲＮＡのスプライシングに関与する核ＲＮＰの１つである、Ｕ１核内低分子リボ核タンパク質上にユニークに存在するタンパク質と反応する。他の状態に関連した自己抗体、例えば、抗Ｓｍ、抗Ｒｏ／ＳＳＡ、および抗Ｌａ／ＳＳＢなどは、オーバーラップ症候群を有する患者において時折見つかる。抗Ｋｕは、筋炎－強皮症オーバーラップ症候群、およびＳＬＥにおいて見つかった。Ｋｕ抗原は、ともにクローン化されている２種のポリペプチド成分を有するＤＮＡ結合タンパク質複合体である。抗Ｊｏ－１および他の抗合成酵素は、疾患特異的である。他の筋炎関連抗体は、多くが多発性筋炎－強皮症オーバーラップを有する筋炎患者の約５～１０％において存在する抗ＰＭ－Ｓｃｌ、およびほとんどもっぱら皮膚筋炎において、筋炎患者の約８％において存在する抗Ｍｉ－２である。抗Ｍｉ－２は、すべての皮膚筋炎患者の約２０％において高い力価で、多発性筋炎患者の５％未満において、ＥＬＩＳＡのみによって、低力価で見つかる（TargoffおよびReichlin、Mt. Sinai J. of Med.、５５巻：４８７～４９３頁、１９８８年）。

【００１７】

一般に、炎症性筋肉疾患（ＩＭＤ）および間質性肺疾患（ＩＬＤ）を有する患者は、相対的に若いとき、かつその他は良好な健康で現れ、残念ながら患者のサブセットにおいて、疾患が進行すると、著しい身体障害および高い死亡率がもたらされ得る。さらに現在、ＩＭＤおよびＩＬＤの一般的な集団を処置するために特に認可された薬物はまったくない。現在のスタンダードオブケアは、非特異的な抗炎症薬および免疫調節薬、例えば、メトトレキサートまたはアザチオプリン、および症状が寛解しない場合、シクロスポリンなどを投与することである（Wallaceら、J. Musculoskelat Med.、２７巻：４７０～４７９

頁、２０１０年）。これらの薬物は、慢性投与で重篤となり得る副作用の実質的なリスクを保有する。重篤な進行性疾患では、個体は、静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）で処置される場合がある。ＩＶＩＧで患者を処置する負担およびコストオブケアは高く（毎月の処置当たり、患者一人当たり１０，０００ドルもの多さ）、かなりの割合の患者が治療に失敗し、死ぬ。

【００１８】

したがって、治療上有効および費用効果的の両方である、炎症性筋肉疾患および関連状態を処置する改善された方法の重大な未充足ニーズが残っている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１９】

【特許文献１】米国特許第６，６１０，８２３号明細書

【非特許文献】

【００２０】

【非特許文献１】Rudinger-Thirionら、PNAS USA、１０８巻（４０号）：Ｅ７９４～Ｅ８０２頁、２０１１年

【非特許文献２】Tzioufas Orphanet（２００１年）１～５頁

【非特許文献３】Parkら、Rheumatol. Int.、３１巻：５２９～５３２頁、２０１１年

【非特許文献４】Plotzら、Annals of Internal Med.、１１１巻：１４３～１５７頁、１９８９年

【非特許文献５】Wallaceら、J. Musculoskelat Med.、２７巻（１２号）４７０～４７９頁、２０１０年

【非特許文献６】ReichlinおよびArnett、Arthritis and Rheum.、２７巻：１１５０～１１５６頁、１９８４年

【非特許文献７】TargoffおよびReichlin、Arthritis and Rheum.、２８巻：７９６～８０３頁、１９８５年

【非特許文献８】NishikaiおよびReichlin、Arthritis and Rheum.、２３巻：８８１～８８８頁、１９８０年

【非特許文献９】Reichlinら、J. Clin. Immunol.、４巻：４０～４４頁、１９８４年

【非特許文献１０】Antigens associated with polymyositis and with dermatomyositis

【非特許文献１１】TargoffおよびReichlin、Mt. Sinai J. of Med.、５５巻：４８７～４９３頁、１９８８年

【非特許文献１２】NishikaiおよびReichlin、Arthritis Rheum.、２３巻：８８１～８８８頁、１９８０年

【非特許文献１３】Targoff、Curr. Opin. Rheumatol.、１２巻、４７５～４８１頁、２０００年

【非特許文献１４】Betteridgeら、Rheumat.、４６巻、１００５～１００８頁、２００７年

【非特許文献１５】Loveら、Medicine.、７０巻：３６０～３７４頁、１９９１年TargoffおよびReichlin、Mt. Sinai J. of Med.、５５巻：４８７～４９３頁、１９８８年

【非特許文献１６】Wallaceら、J. Musculoskelat Med.、２７巻：４７０～４７９頁、２０１０年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００２１】

本発明の実施形態は、例えば、ＨＲＳポリペプチドまたは他の抗体特異的遮断剤を用いて、そうしなければ病原性である抗Ｊｏ－１抗体（Ｊｏ－１抗体とも呼ばれる）の活性、結合、または産生を特異的に遮断することが、炎症疾患または自己免疫疾患を有する被験体を処置するのに有用であり得、疾患進行を防止し、または有意に遅延させることができ

るという意外な発見に部分的に基づく。この発見の一利点は、抗Ｊｏ－１抗体の悪影響を、被験体の免疫系の衰弱をほとんど、またはまったく伴うことなく克服することができ、副作用プロファイルを著しく低減することである。さらに、この手法は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（histidyl-tRNA synthetase）が局所的または一時的に不足している場合の炎症疾患および関連障害を含めた他の疾患に広く適用可能である。

【００２２】

したがって、ある特定の実施形態は、配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが約２０～９０アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、組成物／ＨＲＳポリペプチドは、ａ）少なくとも約９５％純粋であり、ｂ）約５％未満凝集しており、ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物に関する。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドの少なくとも２０アミノ酸は、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドの少なくとも４０アミノ酸は、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドの少なくとも６０アミノ酸は、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する。

【００２３】

配列番号１と少なくとも９０％同一である８０以上の連続したアミノ酸を含む、長さが少なくとも約４００アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、組成物／ＨＲＳポリペプチドは、ａ）少なくとも約９５％純粋であり、ｂ）約５％未満凝集しており、ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物も含まれる。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１と少なくとも９０％同一である２００以上のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１と少なくとも９０％同一である４００以上のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、長さが少なくとも約５００アミノ酸である。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、全長ヒトＨＲＳの配列（配列番号１）を含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１の残基５０５でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０５））かまたは配列番号１の残基５０６でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０６））。

【００２４】

ある特定の実施形態は、配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが少なくとも約４００アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、組成物／ＨＲＳポリペプチドは、ａ）少なくとも約９５％純粋であり、ｂ）約５％未満凝集しており、ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物に関する。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが少なくとも約５００アミノ酸である。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１（全長ヒトＨＲＳ）の配列を含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１の残基５０５でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０５））かまたは配列番号１の残基５０６でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０６））。

【００２５】

配列番号７０（ＨＲＳ（１～５０６））と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く、長さが５００～５０６アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、組成物／ＨＲＳポリペプチドは、ａ）少なくとも約９５％純粋であり、ｂ）約５％未満凝集しており、ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物も含まれる。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号７０と少なくとも９０％同一である、長さが５０５～５０６アミノ酸である。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、長さが５０６アミノ酸である。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号７０を含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号７０から本質的になる。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号７０からなる。いくつかの実施形態では、

ＨＲＳポリペプチドは、長さが５０５アミノ酸である。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））を含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））から本質的になる。具体的な実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））からなる。

【００２６】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１つのシステイン残基の変異を有する。ある特定の実施形態では、少なくとも１つのシステイン残基は、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、およびＣｙｓ４５５から選択される。

【００２７】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチド（例えば、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く）は、約４～４０℃、および約６．０～８．０のｐＨの範囲の同等の条件下で、配列番号１（全長ヒトＨＲＳ）のポリペプチドと比べて、生物活性、安定性、および／または均一性が増大している。いくつかの実施形態では、条件は、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約２０～２５℃（室温）の温度、および約７．０～７．５のｐＨを含む。ある特定の実施形態では、条件は、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約３７℃の温度、および約７．０～７．５のｐＨを含む。

【００２８】

いくつかの実施形態では、活性の増大は、少なくとも約１０％の非カノニカル生物活性の絶対的増大を含む。いくつかの実施形態では、非カノニカル活性は、抗炎症活性、または抗Ｊｏ－１抗体への特異的結合である。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１（全長ＨＲＳ）のポリペプチドと比べて、還元条件下での鎖間ジスルフィド形成が低減されている。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１（全長ＨＲＳ）のポリペプチドと比べて、（電荷）不均一性が低減されている。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１（全長ＨＲＳ）のポリペプチドと比べて、溶液中での高分子量凝集体の形成が低減されている。ある特定の実施形態では、均一性の増大は、配列番号１のポリペプチドと比べて、ＨＲＳポリペプチドの単分散の少なくとも１０％の増大を含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１（全長ＨＲＳ）のポリペプチドと比べて、Ｅ．ｃｏｌｉ中で組換え産生される際の可溶性タンパク質の収率が増大している。

【００２９】

ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、異種融合パートナー、必要に応じてＴ細胞リガンドに融合されている。特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種のＤ－アミノ酸を含む。

【００３０】

いくつかの実施形態では、治療用組成物は、約０．０３ｍＭ～約１００ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、治療用組成物は、約２ｍＭ～約５０ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む。ある特定の実施形態では、治療用組成物は、約４０ｍＭ～約６０ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む。ある特定の実施形態では、治療用組成物は、約４５ｍＭ～約５５ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、治療用組成物は、約５０ｍＭの濃度で緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤、クエン酸緩衝剤、またはリン酸緩衝剤である。

【００３１】

ある特定の実施形態では、緩衝剤はヒスチジン緩衝剤であり、ＨＲＳポリペプチドは、約４～４０℃、および約７．０～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、前記ヒスチジン緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している。

【００３２】

ある特定の実施形態では、緩衝剤はクエン酸緩衝剤であり、ＨＲＳポリペプチドは、約４～４０℃、および約６．５～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、前記クエン酸緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している。

【００３３】

ある特定の実施形態では、緩衝剤はリン酸緩衝剤であり、ＨＲＳポリペプチドは、約４～４０℃、および約７．０～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、前記リン酸緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している。

【００３４】

いくつかの実施形態では、条件（例えば、比較のため）は、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約５℃の温度を含む。いくつかの実施形態では、条件は、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約２０～２５℃（室温）の温度を含む。ある特定の実施形態では、条件は、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約３７℃の温度を含む。

【００３５】

いくつかの実施形態では、安定性の増大は、熱安定性を含み、ＨＲＳポリペプチドの融解温度（Ｔｍ）は、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドのものより少なくとも約５℃高い。いくつかの実施形態では、安定性の増大は、熱安定性を含み、ＨＲＳポリペプチドの融解温度は、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドのものより少なくとも１０％遅い速度でアンフォールドさせる。

【００３６】

ある特定の実施形態では、本組成物は、その他は同等の条件下で、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の組成物と比べて、凝集および／または沈降が低減している。いくつかの実施形態では、凝集は、Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、少なくとも約１０％低減されている。ある特定の実施形態では、本組成物は、その他は同等の条件下で、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の組成物と比べて、高分子量凝集体が低減している。

【００３７】

いくつかの実施形態では、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤であり、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、クエン酸緩衝剤であり、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）である。

【００３８】

いくつかの実施形態では、組成物は、約１００～３００ｍＭの範囲の濃度で、必要に応じて約１４０ｍＭ～２４０ｍＭで、または必要に応じて、約１４０ｍＭで塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を含む。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠き、必要に応じて、少なくとも約６０℃の融解温度（Ｔｍ）を有する。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）であり、必要に応じて、少なくとも約６０℃の融解温度（Ｔｍ）を有する。

【００３９】

ある特定の実施形態では、本組成物は、１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤を含む。いくつかの実施形態では、１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤は、スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、アルギニン、グリシン、およびグリセロールから選択される。いくつかの実施形態では、１種または複数種の薬学的に許

容される賦形剤は、約０．２～５．０％の範囲の濃度である。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、約１～３％のスクロース、必要に応じて約２％のスクロースである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、約１～３％のトレハロース、必要に応じて約２％のトレハロースである。

【００４０】

いくつかの実施形態では、本組成物は、１種または複数種の界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベートまたはポロキサマーである。いくつかの実施形態では、ポリソルベートは、ポリソルベート２０（ＰＳ２０）、ポリソルベート４０（ＰＳ４０）、ポリソルベート６０（ＰＳ６０）、またはポリソルベート８０（ＰＳ８０）である。ある特定の実施形態では、ポリソルベートは、ＰＳ２０である。ある特定の実施形態では、ポロキサマーは、プルロニックＦ６８である。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、約０．１～５．０％（ｗ／ｖ）の範囲で存在する。いくつかの実施形態では、約０．０５％（ｗ／ｖ）のＰＳ２０である。

【００４１】

ある特定の実施形態では、本組成物は、１種または複数種の抗酸化化合物または還元剤を含む。いくつかの実施形態では、抗酸化化合物または還元剤は、システイン、メチオニン、およびＮ－アセチルシステイン（ＮＡＣ）から選択される。いくつかの実施形態では、抗酸化化合物または還元剤は、約０．１～５．０ｍＭの濃度範囲で存在する。

【００４２】

ある特定の実施形態では、本組成物は、１種または複数種のキレート化剤を含む。いくつかの実施形態では、キレート化剤は、エチレンジアミンテトラアセテート（ＥＤＴＡ）である。いくつかの実施形態では、キレート化剤は、約０．１～２．０ｍＭの濃度範囲で存在する。

【００４３】

ある特定の組成物中で、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも約１０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する。いくつかの組成物中で、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも約２５ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する。いくつかの組成物中で、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも約５０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する。

【００４４】

ある特定の実施形態では、本組成物は、Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、約０．５未満の濁度を有する。いくつかの実施形態では、Ａ３４０での吸光度は、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される。いくつかの実施形態では、Ａ３４０での吸光度は、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される。ある特定の実施形態では、Ａ３４０での吸光度は、少なくとも１、２、３、４、または５回、組成物を凍結融解した後に測定される。

【００４５】

いくつかの実施形態では、本組成物は、Ａ５８０での吸光度によって測定した場合、約０．６未満の不透明度（opalescence）を有する。いくつかの実施形態では、Ａ５８０での吸光度は、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される。いくつかの実施形態では、Ａ５８０での吸光度は、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される。ある特定の実施形態では、Ａ５８０での吸光度は、少なくとも１、２、３、４、または５回、組成物を凍結融解した後に測定される。

【００４６】

いくつかの実施形態では、組成物は、約３％未満の高分子量凝集体を有する。いくつかの実施形態では、高分子量（ＨＭＷ）凝集は、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される。ある特定の実施形態では、高分子量（ＨＭＷ）凝集は、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される。いくつかの実施形態では、高分子量凝集は、少なくとも

１、２、３、４、または５回、組成物を凍結融解した後に測定される。

【００４７】

ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも約５０℃の組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも約５５℃の組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも約６０℃の組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する。

【００４８】

ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも約９０％または９５％単分散である。

【００４９】

いくつかの実施形態では、本組成物は、約５０ｍＭのＬ－ヒスチジン、約１４０ｍＭのＮａＣｌ、約２％のトレハロース、約０．０５％のポリソルベート２０（ＰＳ２０）を含み、約７．０～７．４のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５０ｍＭのＬ－ヒスチジン、約１４０ｍＭのＮａＣｌ、約２％のスクロース、約０．０５％のポリソルベート２０（ＰＳ２０）を含み、約７．０～７．４のｐＨを有する。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）であり、少なくとも約６０℃の組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する。ある特定の実施形態では、本組成物は、Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、約０．１未満、または約０．０５未満の濁度を有する。いくつかの実施形態では、本組成物は、Ａ５８０での吸光度によって測定した場合、約０．１未満、または約０．０５未満の不透明度を有する。ある特定の実施形態では、本組成物は、約２％未満または約１％未満の高分子量凝集体を有する。

ある特定の実施形態では、本発明は、ヒトＨＲＳ（配列番号１）と少なくとも９０％の同一性を有する約２０～９０アミノ酸の間のポリペプチドを含む医学的に有用な組成物を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも２０～４０アミノ酸がヒトＨＲＳ（配列番号１）のアミノ酸１～６７以内にある。特定の実施形態では、少なくとも１種のアミノ酸は、Ｄアミノ酸である。いくつかの態様では、ポリペプチドは、ａ）少なくとも約９５％純粋であり、ｂ）約５％未満凝集しており、ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない

【００５０】

別の実施形態では、本発明は、ＨＲＳポリペプチドの少なくとも約４００アミノ酸のポリペプチドを含む医学的に有用な組成物であって、ポリペプチドは、ａ）少なくとも約９５％純粋であり、ｂ）約５％未満凝集しており、ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、医学的に有用な組成物を含む。

【００５１】

別の実施形態では、本発明は、少なくとも約４００アミノ酸のポリペプチドを含む医学的に有用な組成物であって、ポリペプチドは、ａ）ヒトＨＲＳ（配列番号１）と少なくとも８０％同一であり、ｂ）少なくとも約９５％純粋であり、ｃ）約５％未満凝集しており、ｄ）実質的にエンドトキシンを含まない、医学的に有用な組成物を含む。

【００５２】

これらの医学的に有用な組成物または治療用組成物のいずれかのいくつかの態様では、ポリペプチドは、全長ＨＲＳポリペプチドを含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、残基約５０５または５０６でトランケートされている。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、システイン残基で少なくとも１つの変異を有する。いくつかの態様では、システイン残基は、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される。いくつかの態様では、ポリペプチドは、少なくとも１種のＤアミノ酸を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドは、ＷＨＥＰドメインを含む。いくつかの態様では、ポリペプチドは、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれか、または表１～９のいずれかに列挙された、もしくはこれらから導き出せるアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では

、ポリペプチドは、異種タンパク質に融合されている。いくつかの態様では、異種タンパク質は、Ｔ細胞リガンドを含む。いくつかの態様では、本組成物は、経口、鼻腔内、経肺、または非経口（parental）投与を介する送達のために製剤化される。

【００５３】

いくつかの態様では、医学的に有用な組成物または治療用組成物は、自己免疫疾患、炎症疾患や、（特発性）炎症性筋疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、および関連障害を含めた炎症性筋疾患、多発性筋炎－強皮症オーバーラップ、封入体筋炎（ＩＢＭ）、抗合成酵素症候群、間質性肺疾患、関節炎、レイノー（Reynaud's）現象、ペロー症候群、ならびにアッシャー症候群からなる群から選択される疾患の処置において使用するためのものである。いくつかの態様では、エピトープは、被験体に由来する血清中の抗体によって認識される免疫優性エピトープである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、ヒト組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩまたはクラスＩＩ分子に結合する。いくつかの態様では、核酸は、発現コントロール配列に作動可能にカップリングしており、核酸が発現されると寛容化が引き起こされる。いくつかの態様では、治療用組成物は、リポソーム、ミセル、エマルジョン、および細胞からなる群から選択される送達ビヒクルを含む。

【００５４】

別の実施形態では、本発明は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含み、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１種のカノニカルまたは非カノニカル機能に取って代わることができる、治療用組成物を含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、最大約５×１０$^{-7}$Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない。

【００５５】

別の実施形態では、本発明は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、寛容化を引き起こすことができる、治療用組成物を含む。

【００５６】

別の実施形態では、本発明は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、哺乳動物ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸を含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、核酸は、発現コントロール配列に作動可能にカップリングしており、核酸が発現されると寛容化が引き起こされる、治療用組成物を含む。

【００５７】

別の実施形態では、本発明は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、組換え宿主細胞を含み、宿主細胞は、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含む少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現し、核酸は、宿主細胞内でＨＲＳの発現を可能にするように発現コントロール配列に作動可能にカップリングしている、治療用組成物を含む。

【００５８】

別の実施形態では、本発明は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、自己抗体に特異的な抗体または結合タンパク質を含み、抗体または結合タンパク質は、天然ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素への自己抗体の結合を遮断する、治療用組成物を含む。

【００５９】

いくつかの実施形態は、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、炎症疾患の処置

において使用するための治療用組成物であって、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物に関する。

【００６０】

少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、筋ジストロフィーの処置において使用するための治療用組成物であって、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物も含まれる。いくつかの態様では、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリードレイフス（Ｅｍｅｒｙ－Ｄｒｅｉｆｕｓｓ）型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、および先天型筋ジストロフィーから選択される。

【００６１】

ある特定の実施形態は、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、横紋筋融解症、筋肉の消耗、悪液質、筋肉炎症、または筋傷害の処置において使用するための治療用組成物であって、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物を含む。

【００６２】

別の実施形態では、本発明は、炎症疾患または自己免疫疾患を処置するための医薬の調製におけるＨＲＳポリペプチドの使用を含む。別の実施形態では、本発明は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患を処置するための医薬の調製におけるＨＲＳポリペプチドの使用を含む。

【００６３】

これらの治療用組成物または使用のいずれかのいくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、寛容を誘導する。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約１０～約６０アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約６０～約１２０アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約１２０～約２００アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、全長である。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、残基約５０５または５０６でトランケートされている。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、システイン残基で少なくとも１つの変異を有する。いくつかの態様では、システイン残基は、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種のＤアミノ酸を含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、ＷＨＥＰドメインを含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、または表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、異種タンパク質に融合されている。いくつかの態様では、異種タンパク質は、Ｔ細胞リガンドを含む。いくつかの態様では、本組成物は、経口、鼻腔内、経肺、または非経口投与を介する送達のために製剤化される。いくつかの態様では、治療用組成物は、リポソーム、ミセル、エマルジョン、および細胞からなる群から選択される送達ビヒクルを含む。

【００６４】

自己抗体に関連した疾患を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞、またはｄ）自己抗体に特異的な抗体もしくは結合タンパク質の１種または複数を含む治療用組成物を投与するステップを含む、方法も含まれる。

【００６５】

いくつかの態様では、治療用組成物は、疾患症状が出現する前に、被験体に投与される。いくつかの態様では、自己抗体は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素に特異的である。いく

つかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、疾患特異的自己抗体によって認識されるヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１種のエピトープを含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体の天然ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素への結合を遮断する。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、自己反応性Ｔ細胞のクローン除去を引き起こす。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、自己免疫応答に関与するＴ細胞の機能的不活化を引き起こす。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、筋肉炎症または肺炎症を低減する。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、寛容を誘導する。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約１０～約６０アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約６０～約１２０アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約１２０～約２００アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、全長である。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、残基約５０５または５０６でトランケートされている。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、システイン残基で少なくとも１つの変異を有する。いくつかの態様では、システイン残基は、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される。いくつかの態様では、全長ＨＲＳ（配列番号１）に対応する残基５０７、５０８、および５０９が欠失している。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種のＤアミノ酸を含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、ＷＨＥＰドメインを含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、または表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、異種タンパク質に融合されている。いくつかの態様では、異種タンパク質は、Ｔ細胞リガンドを含む。いくつかの態様では、本組成物は、経口、鼻腔内、経肺、または非経口投与を介する送達のために製剤化される。

【００６６】

いくつかの態様では、疾患は、本明細書に記載の他の疾患または状態の中でも、炎症性筋疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、および関連障害を含めた炎症性筋疾患、多発性筋炎－強皮症オーバーラップ、封入体筋炎（ＩＢＭ）、抗合成酵素症候群、間質性肺疾患、関節炎、ならびにレイノー現象からなる群から選択される。いくつかの態様では、エピトープは、被験体に由来する血清中の抗体によって認識される免疫優性エピトープである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、ヒト組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩ分子に結合する。いくつかの態様では、核酸は、発現コントロール配列に作動可能にカップリングしており、核酸が発現されると寛容化が引き起こされる。いくつかの態様では、治療用組成物は、リポソーム、ミセル、エマルジョン、および細胞からなる群から選択される送達ビヒクルを含む。

組織炎症を低減する方法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法も含まれる。いくつかの態様では、組織は、筋肉、肺、および皮膚から選択される。

【００６７】

いくつかの実施形態は、筋肉炎症または肺炎症を低減する方法であって、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む治療用組成物を被験体に投与するステップを含む、方法に関する。

【００６８】

筋ジストロフィーを処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成

物を投与するステップを含む、方法も含まれる。いくつかの態様では、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、および先天型筋ジストロフィーから選択される。

【００６９】

いくつかの実施形態は、横紋筋融解症、筋肉の消耗、悪液質、筋肉炎症、または筋傷害を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法に関する。

【００７０】

ある特定の実施形態は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する寛容を誘導する方法であって、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む治療用組成物を被験体に投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、組成物を投与すると、自己抗原に対する寛容化が引き起こされる、方法を含む。

【００７１】

いくつかの実施形態は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する自己免疫応答に関与するＴ細胞のセットまたはサブセットを排除するための方法であって、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む治療用組成物を被験体に投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、組成物を投与すると、自己反応性Ｔ細胞のクローン除去が引き起こされる、方法を含む。

【００７２】

ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する自己免疫応答に関与するＴ細胞内でアネルギーを誘導するための方法であって、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、組成物を投与すると、自己免疫応答に関与するＴ細胞の機能的不活化が引き起こされる、方法も含まれる。

【００７３】

いくつかの実施形態は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患を処置するための補充療法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞、またはｄ）自己抗体に特異的な抗体もしくは結合タンパク質の１種または複数を含む治療用組成物を投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素不足を機能的に補償する、補充療法。

【００７４】

炎症性疾患または自己免疫疾患を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む治療用組成物を投与するステップを含む、方法も含まれる。

【００７５】

いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、最大約５×１０$^{-7}$Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない。

【００７６】
いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約１０～約６０アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約６０～約１２０アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約１２０～約２００アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約２００～約４００アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、約４００～約５００アミノ酸の長さである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、全長である。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、残基約５０５または５０６でトランケートされている。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、システイン残基で少なくとも１つの変異を有する。いくつかの態様では、システイン残基は、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種のＤアミノ酸を含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、ＷＨＥＰドメインを含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、または表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、異種タンパク質に融合されている。いくつかの態様では、異種タンパク質は、Ｔ細胞リガンドを含む。いくつかの態様では、本組成物は、経口、鼻腔内、経肺、または非経口投与を介する送達のために製剤化される。いくつかの態様では、疾患は、炎症性筋疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、および関連障害を含めた炎症性筋疾患、多発性筋炎－強皮症オーバーラップ、封入体筋炎（ＩＢＭ）、抗合成酵素症候群、間質性肺疾患、関節炎、ならびにレイノー現象からなる群から選択される。いくつかの態様では、エピトープは、被験体に由来する血清中の抗体によって認識される免疫優性エピトープである。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、ヒト組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩ分子に結合する。いくつかの態様では、核酸は、発現コントロール配列に作動可能にカップリングしており、核酸が発現されると寛容化が引き起こされる。いくつかの態様では、治療用組成物は、リポソーム、ミセル、エマルジョン、および細胞からなる群から選択される送達ビヒクルを含む。

【００７７】
試料中のＨＲＳポリペプチドまたはその断片の存在またはレベルを判定する方法であって、試料を、ＨＲＳポリペプチドに特異的に結合する１種または複数種の結合剤と接触させるステップと、結合剤の存在または非存在を検出し、それによってＨＲＳポリペプチドの存在またはレベルを判定するステップとを含む、方法も含まれる。

【００７８】
いくつかの実施形態は、特定のＨＲＳポリペプチドに対する抗ＨＲＳポリペプチド抗体のエピトープ特異性を判定する方法であって、抗体を１種または複数種のＨＲＳポリペプチドと接触させるステップと、結合剤の存在または非存在を検出し、それによって、抗体のエピトープ特異性を判定するステップとを含む、方法を含む。本方法のいくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、最大約８０アミノ酸の長さであり、ＷＨＥＰドメインを含む。

【００７９】
いくつかの実施形態は、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む治療用組成物を投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、最大約1×10^{-7}Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない、方法を含む。

【００８０】
本発明の別の態様では、ＨＲＳポリペプチドは、患者のプロファイルを作成して患者のＪｏ－１抗体疾患負荷を特定するのに使用することができる。このようなプロファイルに

より、ＨＲＳポリペプチド処置から恩恵を受けるはずである亜集団の中に患者を選択することが可能になり、見込みのある治療効果が予後判定され、かつ／または治療剤として使用するのに最も適したＨＲＳポリペプチド（複数可）が同定される。

【００８１】

したがって、ある特定の実施形態は、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を有するリスクのあるヒト被験体を同定するための方法であって、ａ）被験体における抗ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、ｂ）被験体がヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素またはＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして被験体を同定するステップとを含む、方法に関する。いくつかの態様では、被験体が、その血清中に約２マイクロモル濃度より高い濃度のヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして被験体を同定することができる。いくつかの態様では、被験体が、その血清中に約４マイクロモル濃度より高い濃度のヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして被験体を同定することができる。

【００８２】

自己免疫状態または炎症状態を有するヒト被験体を処置するためのＨＲＳポリペプチドを選択するための方法であって、ａ）被験体における抗ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、ｂ）野生型ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素と比較して抗ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体に対する親和性が低減しているＨＲＳポリペプチドを選択するステップとを含む、方法も含まれる。

【００８３】

いくつかの実施形態は、ヒト被験体の疾患進行を予後判定するための方法であって、ａ）被験体における抗ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、ｂ）被験体が、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素またはＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、より重篤な疾患を生じさせるリスクがあるとして被験体を同定するステップとを含む、方法に関する。

【００８４】

ＨＲＳポリペプチド投与に対する被験体の応答を予測するための方法であって、ａ）被験体における抗ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、ｂ）被験体が、ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素またはＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体をまったく有さない場合、ＨＲＳポリペプチド投与に適しているとして被験体を同定するステップとを含む、方法も含まれる。

【００８５】

いくつかの態様では、被験体が、その血清中に約１マイクロモル濃度より高いヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に適しているとして被験体を同定することができる。

【００８６】

いくつかの態様では、被験体が、その血清中に約０．１マイクロモル濃度未満のヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に適しているとして被験体を同定することができる。

【００８７】

いくつかの態様では、被験体が、その血清中に約０．０１マイクロモル濃度未満のヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に適しているとして被験体を同定することができる。

【００８８】

細胞外体液から抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）抗体を体外免疫吸着させるための方法であって、（ａ）被験体から得られた細胞外体液を準備するステップと、（ｂ）細胞外体液を、少なくとも１種のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素ポリペプチドが付着し

た生体適合性固体支持体と接触させ、それによって固体支持体上に抗ＨＲＳ抗体を捕捉するステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）からの細胞外体液を被験体中に再注入するステップとを含む、方法も含まれる。いくつかの態様では、抗ＨＲＳ抗体は、抗Ｊｏ－１抗体を含む。

【図面の簡単な説明】

【００８９】

【図１】図１は、結腸炎のＴＮＢＳ誘導モデルにおける例示的なＨＲＳ由来ポリペプチドの潜在的な抗炎症性の性質を示す。１２匹のマウス／群の雄ＢＤＦ－１マウスにおいて試験を行った；５ｍｇ／ｋｇのＴＮＢＳおよびブデソニドを水に加えた。ＴＮＢＳ処置の３日前から始めて、１または５ｍｇ／Ｋｇの濃度のリゾカイン（Resokine）（ＨｉｓＲＳ^{N4}；ＨＲＳ（１～６０））をＩＶ注射により毎日投与した。

【００９０】

【図２】図２は、非還元および還元条件下における全長ＨＲＳおよびＨＲＳ（１～５０６）のＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析を示す。ゲルは、全長ＨＲＳが、正常および還元条件下の両方において非共有結合およびＳＳ連結した二量体がほぼ５０：５０の混合物であることを示し、ＨＲＳ（１～５０６）が、全長タンパク質と比べてＳＳ連結した二量体形成の有意な低下、均一性の増加および単分散度を示すことを示す。

【００９１】

【図３】図３は、全長野生型ＨｉｓＲＳが９６ウェルプレートの表面に付着されたＥＬＩＳＡアッセイによる、全長ＨＲＳと抗Ｊｏ－１抗体含有血清との競合を示す。この図は、ヒト血清試料から得られた血清の３種の希釈のデータを示す。

【００９２】

【図４】図４は、全長野生型ＨｉｓＲＳが９６ウェルプレートの表面に付着されたＥＬＩＳＡアッセイによる、全長ヒトＨｉｓＲＳ（ＦＬ－ｈｕ　ＨｉｓＲＳ）と比較した、リゾカイン（ＨｉｓＲＳ^{N4}；ＨＲＳ（１～６０））と抗Ｊｏ－１抗体含有血清との競合を示す。データは、全長ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素がプレートの表面に付着されている場合、約１×１０$^{-7}$Ｍを超える濃度で存在するまで、リゾカインが全長ＨｉｓＲＳとの抗体結合を有意に競合しないことを示す。

【００９３】

【図５】図５は、全長ヒト野生型ＨｉｓＲＳが９６ウェルプレートの表面に付着されたＥＬＩＳＡアッセイによる、全長ヒトＨｉｓＲＳと比較した、ＨｉｓＲＳ^{N8}（ＨＲＳ（１～５０６））と抗Ｊｏ－１抗体含有血清との競合を示す。データは、ＨｉｓＲＳ^{N8}および全長ＨｉｓＲＳが、抗Ｊｏ－１抗体に対して実質的に同一の競合結合曲線を共有することを示す。

【００９４】

【図６】図６は、プレート表面に付着された本質的に全長ＨＡＲＳまたはＨｉｓＲＳ^{N4}（ＨＲＳ（１～６０））のいずれかを用いた、抗Ｊｏ－１抗体の標準力価測定ＥＬＩＳＡを示す。データは、これらの条件下でアッセイが行われる場合、抗Ｊｏ－１抗体含有血清におけるＨｉｓＲＳ^{N4}に対する抗体の見かけ上の力価が、全長ＨｉｓＲＳに匹敵することを示す。

【００９５】

【図７】図７は、エピトープマッピング試験において使用されるＨＲＳスプライスバリアントおよび他のＨＲＳ構築物の略図を示す。

【００９６】

【図８】図８は、エピトープマッピング試験の結果を示し、ＷＨＥＰドメイン（ＨｉｓＲＳ^{N4}；ＳＶ９；またはＨＲＳ（１～６０））またはＷＨＥＰドメインを欠く欠失ＨｉｓＲＳ（配列番号１のアミノ酸５４～５０６を含む）（ｄＷＨＥＰ）構築物との結合に関する広範なＪｏ－１陽性抗体試料の抗体選択性を表示する。

【００９７】

【図９】図９は、全長ＨＲＳおよびＨＲＳ（１～５０６）を用いた免疫枯渇試験の結果を

示す。結果は、全長ＨＡＲＳおよびＨＲＳ（１～５０６）の両方が、ヒト血清試料からのＪｏ－１抗体の免疫枯渇において有効であったことを示し、ＨＲＳ（１～５０６）が、検出可能なＪｏ－１抗体の最大９９％を除去することができたことを示す。

【００９８】

【図１０Ａ】図１０Ａは、スタチン誘導性筋炎のラットモデルにおけるＨＲＳ（１～５０６）（またはＡＴＹＲ１９４０）の効果の評価に使用した投薬戦略の図表を示す。

【図１０Ｂ】図１０Ｂは、スタチン誘導性筋炎のラットモデルにおける筋肉トロポニンレベルの低下におけるＨＲＳ（１～５０６）の効果を示す。

【００９９】

【図１１Ａ】図１１Ａ～図１１Ｂは、スタチン誘導性筋炎のラットモデルにおける、ＣＫレベルにおけるＨＲＳ（１～５０６）の効果を示す。

【図１１Ｂ】図１１Ａ～図１１Ｂは、スタチン誘導性筋炎のラットモデルにおける、ＣＫレベルにおけるＨＲＳ（１～５０６）の効果を示す。

【０１００】

【図１２】図１２は、内在性血清ＨＲＳレベルが、未処置ラットと比べてスタチン処置ラットにおいて上昇したことを示す。この結果は、内在性ＨＲＳの放出が、筋肉炎症の調節における役割を果たし得ることを示唆する。

【０１０１】

【図１３】図１３は、スタチン誘導性筋炎のラットモデルにおける大腿屈筋のＨ＆Ｅ染色を示す。これらの結果は、ビヒクル処置および０．３ｍｇ／ｋｇ　ＨＲＳ（１～５０６）処置ラットと比べた、１ｍｇ／ｋｇおよび３ｍｇ／ｋｇ　ＨＲＳ（１～５０６）で処置したスタチン誘導性ラットにおける筋肉変性／壊死および炎症スコアの低下を示す。

【０１０２】

【図１４】図１４は、増加量のＨＲＳ（１～５０６）で処置したスタチン誘導ラットの大腿屈筋の筋肉において行ったＲＮＡプロファイリングの結果を示す。これらの結果は、スタチン処置に応答して５倍超上昇した全１３遺伝子が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により低下したことを実証した。

【０１０３】

【図１５Ａ】図１５Ａは、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の筋肉において行ったＲＮＡプロファイリングの結果を示す。

【図１５Ｂ】図１５Ｂは、ＨＲＳ（１～５０６）で処置したスタチン誘導ラットの結果を示す。

【０１０４】

【図１６】図１６は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、１０種の糖尿病／メタボリックシンドローム関連遺伝子および数種のハウスキーピング遺伝子（データ図示せず）の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により有意に影響されなかったことを明らかにした。

【０１０５】

【図１７】図１７は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、多数の免疫細胞マーカー遺伝子の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により低下したことを明らかにした。

【０１０６】

【図１８Ａ】図１８Ａ～図１８Ｄは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、免疫細胞マーカー遺伝子ＩＴＧＡＬ（ＣＤ１１ａ）（図１８Ａ）、ＣＤ１１ｂ（図１８Ｂ）、ＣＤ８ａ（図１８Ｃ）、ＣＤ８ｂ（図１８Ｄ）の発現を低下させたことを示す。

【図１８Ｂ】図１８Ａ～図１８Ｄは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、免疫細胞マーカー遺伝子ＩＴＧＡＬ（ＣＤ１１ａ）（図１８Ａ）、ＣＤ１１ｂ（図１８Ｂ）、ＣＤ８ａ（図１８Ｃ）、ＣＤ８ｂ（図１８Ｄ）の発現を低下させたことを示す。

【図１８Ｃ】図１８Ａ～図１８Ｄは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、免疫細胞マーカー遺伝子ＩＴＧＡＬ（ＣＤ１１ａ）（図１８Ａ）、ＣＤ１１ｂ（図１８Ｂ）、ＣＤ８ａ（図１

８Ｃ）、ＣＤ８ｂ（図１８Ｄ）の発現を低下させたことを示す。
【図１８Ｄ】図１８Ａ～図１８Ｄは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、免疫細胞マーカー遺伝子ＩＴＧＡＬ（ＣＤ１１ａ）（図１８Ａ）、ＣＤ１１ｂ（図１８Ｂ）、ＣＤ８ａ（図１８Ｃ）、ＣＤ８ｂ（図１８Ｄ）の発現を低下させたことを示す。
【０１０７】
【図１９Ａ】図１９Ａ～図１９Ｃは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、免疫細胞マーカー遺伝子ＣＤ１８（図１９Ａ）、ＣＣＲ５（図１９Ｂ）およびＰＴＰＰＣ（ＣＤ４５Ｒ）（図１９Ｃ）の発現を低下させたことを示す。
【図１９Ｂ】図１９Ａ～図１９Ｃは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、免疫細胞マーカー遺伝子ＣＤ１８（図１９Ａ）、ＣＣＲ５（図１９Ｂ）およびＰＴＰＰＣ（ＣＤ４５Ｒ）（図１９Ｃ）の発現を低下させたことを示す。
【図１９Ｃ】図１９Ａ～図１９Ｃは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、免疫細胞マーカー遺伝子ＣＤ１８（図１９Ａ）、ＣＣＲ５（図１９Ｂ）およびＰＴＰＰＣ（ＣＤ４５Ｒ）（図１９Ｃ）の発現を低下させたことを示す。
【０１０８】
【図２０】図２０は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、多数の炎症マーカー遺伝子の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により低下されたことを明らかにした。
【０１０９】
【図２１Ａ】図２１Ａ～図２１Ｄは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、炎症マーカー遺伝子ＩＬ－６（図２１Ａ）、ＭＣＰ１（図２１Ｂ）、ＩＬ－１０（図２１Ｃ）およびＩＦＮ－ガンマ（図２１Ｄ）の発現を低下させたことを示す。
【図２１Ｂ】図２１Ａ～図２１Ｄは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、炎症マーカー遺伝子ＩＬ－６（図２１Ａ）、ＭＣＰ１（図２１Ｂ）、ＩＬ－１０（図２１Ｃ）およびＩＦＮ－ガンマ（図２１Ｄ）の発現を低下させたことを示す。
【図２１Ｃ】図２１Ａ～図２１Ｄは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、炎症マーカー遺伝子ＩＬ－６（図２１Ａ）、ＭＣＰ１（図２１Ｂ）、ＩＬ－１０（図２１Ｃ）およびＩＦＮ－ガンマ（図２１Ｄ）の発現を低下させたことを示す。
【図２１Ｄ】図２１Ａ～図２１Ｄは、ＨＲＳ（１～５０６）処置が、炎症マーカー遺伝子ＩＬ－６（図２１Ａ）、ＭＣＰ１（図２１Ｂ）、ＩＬ－１０（図２１Ｃ）およびＩＦＮ－ガンマ（図２１Ｄ）の発現を低下させたことを示す。
【０１１０】
【図２２】図２２～図２３は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、様々な接着、発生および線維症関連遺伝子の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により変更されたことを明らかにした。
【図２３】図２２～図２３は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、様々な接着、発生および線維症関連遺伝子の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により変更されたことを明らかにした。
【０１１１】
【図２４Ａ】図２４～図２５は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、筋肉消耗、萎縮症および筋形成に関連する様々な遺伝子の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により変更されたことを明らかにした。図２４Ｂは、ＭＭＰ３の結果を示し、図２４Ｃは、ＭＭＰ９の結果を示す。
【図２４Ｂ】図２４～図２５は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、筋肉消耗、萎縮症および筋形成に関連する様々な遺伝子の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により変更されたことを明らかにした。図２４Ｂは、ＭＭＰ３の結果を示し、図２４Ｃは、ＭＭＰ９の結果を示す。
【図２４Ｃ】図２４～図２５は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、筋肉消耗、萎縮症および筋形成に関連する様々な遺伝子の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により変更されたことを明らかにした。図２４Ｂは、ＭＭ

Ｐ３の結果を示し、図２４Ｃは、ＭＭＰ９の結果を示す。
【図２５】図２４～図２５は、スタチン誘導ラットの大腿屈筋の転写プロファイリングを示す。これらの結果は、筋肉消耗、萎縮症および筋形成に関連する様々な遺伝子の発現が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により変更されたことを明らかにした。図２４Ｂは、ＭＭＰ３の結果を示し、図２４Ｃは、ＭＭＰ９の結果を示す。
【０１１２】
【図２６Ａ】図２６Ａ～図２６Ｂは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）のｍｄｘマウスモデルにおけるＨＲＳ（１～５０６）の効果を示す。ビヒクル対照と比べて、ＨＲＳ（１～５０６）またはデキサメタゾンで処置したマウスにおいて、血清ＣＫ（図２６Ａ）、ＡＳＴ（図２６Ｂ）およびＬＤＨ（図２６Ｃ）の低下が観察された。
【図２６Ｂ】図２６Ａ～図２６Ｂは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）のｍｄｘマウスモデルにおけるＨＲＳ（１～５０６）の効果を示す。ビヒクル対照と比べて、ＨＲＳ（１～５０６）またはデキサメタゾンで処置したマウスにおいて、血清ＣＫ（図２６Ａ）、ＡＳＴ（図２６Ｂ）およびＬＤＨ（図２６Ｃ）の低下が観察された。
【図２６Ｃ】図２６Ａ～図２６Ｂは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）のｍｄｘマウスモデルにおけるＨＲＳ（１～５０６）の効果を示す。ビヒクル対照と比べて、ＨＲＳ（１～５０６）またはデキサメタゾンで処置したマウスにおいて、血清ＣＫ（図２６Ａ）、ＡＳＴ（図２６Ｂ）およびＬＤＨ（図２６Ｃ）の低下が観察された。
【０１１３】
【図２７Ａ】図２７Ａ～図２７Ｂは、ＳＪＬ／Ｊマウスにおける全長マウスＨＲＳ（ｍＨＲＳ）による免疫化の効果を示す。これらのマウスは、ジスフェリンのエクソン４５の３’スプライスジャンクションに１７１ｂｐのインフレーム欠失を有し、筋肉炎症を伴う自発性ミオパチーを発症する。マウスは、肢帯型筋ジストロフィー２Ｂ型（ＬＧＭＤ２Ｂ）等、ヒトジスフェリン欠損ミオパチーの遺伝的モデルを提供する。図２７Ａは、ｍＨｉｓＲＳで免疫化したＳＪＬ／Ｊマウスが、全長ＨｉｓＲＳに対する頑強な抗体応答を皮下に生じたことを示す。図２７Ｂに示す通り、ＨｉｓＲＳ免疫化マウスの筋組織は、細胞浸潤および筋炎の領域を示し、この病理組織学検査と一貫して、２匹の免疫化マウスは、筋炎の徴候を表示した。
【図２７Ｂ】図２７Ａ～図２７Ｂは、ＳＪＬ／Ｊマウスにおける全長マウスＨＲＳ（ｍＨＲＳ）による免疫化の効果を示す。これらのマウスは、ジスフェリンのエクソン４５の３’スプライスジャンクションに１７１ｂｐのインフレーム欠失を有し、筋肉炎症を伴う自発性ミオパチーを発症する。マウスは、肢帯型筋ジストロフィー２Ｂ型（ＬＧＭＤ２Ｂ）等、ヒトジスフェリン欠損ミオパチーの遺伝的モデルを提供する。図２７Ａは、ｍＨｉｓＲＳで免疫化したＳＪＬ／Ｊマウスが、全長ＨｉｓＲＳに対する頑強な抗体応答を皮下に生じたことを示す。図２７Ｂに示す通り、ＨｉｓＲＳ免疫化マウスの筋組織は、細胞浸潤および筋炎の領域を示し、この病理組織学検査と一貫して、２匹の免疫化マウスは、筋炎の徴候を表示した。
【０１１４】
【図２８Ａ】図２８Ａ～図２８Ｂは、全長ＨＲＳおよびＨＲＳ（１～５０６）の示差走査蛍光定量（ＤＳＦ）解析を示す。図２８Ａは、ｐＨ７～７．５におけるインキュベーションにより全長ＨＲＳの２種の熱転移が存在したことを示す。第１の転移は、矢印で示す通り４８℃で起こり、主要な転移は、ほぼ５４℃で起こった。図２８Ｂは、広範な濃度のヒスチジン緩衝剤に及ぶＨＲＳ（１～５０６）の熱安定性または融解温度を示す。結果は、ヒスチジン緩衝剤が、ＨＲＳ（１～５０６）等、ＨＲＳポリペプチドの立体構造を有意に安定化することができることを実証する。
【図２８Ｂ】図２８Ａ～図２８Ｂは、全長ＨＲＳおよびＨＲＳ（１～５０６）の示差走査蛍光定量（ＤＳＦ）解析を示す。図２８Ａは、ｐＨ７～７．５におけるインキュベーションにより全長ＨＲＳの２種の熱転移が存在したことを示す。第１の転移は、矢印で示す通り４８℃で起こり、主要な転移は、ほぼ５４℃で起こった。図２８Ｂは、広範な濃度のヒスチジン緩衝剤に及ぶＨＲＳ（１～５０６）の熱安定性または融解温度を示す。結果は、

ヒスチジン緩衝剤が、ＨＲＳ（１～５０６）等、ＨＲＳポリペプチドの立体構造を有意に安定化することができることを実証する。

【発明を実施するための形態】

【０１１５】

本発明の実施では、反対に具体的に示されない限り、当技術分野の技術の範囲内の分子生物学および組換えＤＮＡ技法の従来法を使用することになり、これらの多くは、実例の目的で以下に記載されている。このような技法は、文献に完全に説明されている。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（３版、２０００年）；DNA Cloning: A Practical Approach、Ｉ＆ＩＩ巻（D. Glover編）；Oligonucleotide Synthesis（N. Gait編、１９８４年）；Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications（P. Herdewijn編、２００４年）；Nucleic Acid Hybridization（B. Hames & S. Higgins編、１９８５年）；Nucleic Acid Hybridization: Modern Applications（BuzdinおよびLukyanov編、２００９年）；Transcription and Translation（B. Hames & S. Higgins編、１９８４年）；Animal Cell Culture（R. Freshney編、１９８６年）；Freshney, R.I.（２００５年）Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique、５版、Hoboken NJ、John Wiley & Sons；B. Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning（３版、２０１０年）；Farrell, R.、RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization（３版、２００５年）. Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications、ACS、Washington、１９９７年；Veronese, F.およびJ.M. Harris編、Peptide and protein PEGylation、Advanced Drug Delivery Reviews、５４巻（４号）４５３～６０９頁（２００２年）；Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applicationsにおける、Zalipsky, S.ら、「Use of functionalized Poly(Ethylene Glycols) for modification of polypeptides」を参照。上記に論じた刊行物は、単に本願の出願日前のそれらの開示について提供されている。本明細書のいずれも、先行発明によって、本発明がそのような開示に先行する権利がないことを承認するものとして解釈されるべきでない。

【０１１６】

定義

別段の定義のない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様の、または等価な任意の方法および材料を、本発明の実践または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が記載されている。本発明の目的のために、以下の用語を以下で定義する。

【０１１７】

冠詞「ａ」および「ａｎ」は、冠詞の文法的対象の１つまたは１つを超える（即ち、少なくとも１つ）を指すように本明細書で使用する。例として、「ａｎ　ｅｌｅｍｅｎｔ」は、１つのエレメントまたは１つを超えるエレメントを意味する。

【０１１８】

「約」とは、参照の量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して３０、２５、２０、１５、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または１％の程度変動する量、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。

【０１１９】

用語「アネルギー」は、抗原による再刺激に対するＴ細胞またはＢ細胞応答の機能的不活化を指す。

【０１２０】

本明細書において、用語「アミノ酸」は、天然に存在する、および天然に存在しないアミノ酸の両方、ならびにアミノ酸類似体および模倣体を意味するように意図されている。天然に存在するアミノ酸としては、例えば、タンパク質生合成の間に利用される２０の（

Ｌ）－アミノ酸、ならびにその他、例えば、４－ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、ホモシステイン、シトルリン、およびオルニチンなどがある。天然に存在しないアミノ酸としては、例えば、当業者に公知である、（Ｄ）－アミノ酸、ノルロイシン、ノルバリン、ｐ－フルオロフェニルアラニン、エチオニンなどがある。アミノ酸類似体には、天然に存在する、および天然に存在しないアミノ酸の修飾体が含まれる。このような修飾は、例えば、アミノ酸上の化学基および部分の置換もしくは置き換え、またはアミノ酸の誘導体化によるものを含み得る。アミノ酸模倣体には、例えば、参照アミノ酸に特徴的な電荷および電荷間隔などの機能的に同様の性質を呈する有機構造体が含まれる。例えば、アルギニン（ＡｒｇまたはＲ）を模倣する有機構造体は、同様の分子空間内に位置した正電荷部分を有するはずであり、天然に存在するＡｒｇアミノ酸の側鎖のｅ－アミノ基と同程度の移動度を有する。模倣体は、アミノ酸またはアミノ酸官能基の最適な間隔および電荷相互作用を維持するように束縛された構造も含む。当業者は、何の構造が機能的に等価なアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を構成するかを知っており、または求めることができる。

【０１２１】

本明細書において、疾患または有害反応を生じさせる「リスクのある」被験体は、検出可能な疾患または疾患の症状を有していても、有していなくてもよく、本明細書に記載の処置方法の前に検出可能な疾患または疾患の症状を示していても、示していなくてもよい。「リスクのある」は、被験体が、本明細書に記載の、かつ当技術分野で公知の、疾患を生じさせることと相関する測定可能なパラメータである１つまたは複数のリスク要因を有することを表す。これらのリスク要因の１つまたは複数を有する被験体は、これらのリスク要因の１つまたは複数を有さない被験体より、疾患または有害反応を生じさせる確率が高い。

【０１２２】

「自己免疫疾患」は、本明細書において使用する場合、個体自体の組織から生じ、かつこれらに対して向けられる疾患または障害である。自己免疫疾患または障害の例としては、それだけに限らないが、乾癬および皮膚炎（例えば、アトピー性皮膚炎）を含めた炎症性皮膚疾患などの炎症反応；全身性強皮症および硬化症；炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎など）に関連した応答；呼吸窮迫症候群（成人呼吸窮迫症候群；ＡＲＤＳを含む）；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；湿疹および喘息などのアレルギー状態、ならびにＴ細胞の浸潤および慢性炎症反応を伴う他の状態；アテローム性動脈硬化症；白血球接着不全症；関節リウマチ；全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；糖尿病（例えば、Ｉ型糖尿病またはインスリン依存性糖尿病（insulin dependent diabetes mellitis）；多発性硬化症；レイノー症候群；自己免疫性甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェーグレン症候群（Sjorgen's syndrome）；若年発症糖尿病；ならびに結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、炎症性筋疾患、間質性肺疾患、肉芽腫症、および血管炎において一般に見つかるサイトカインおよびＴ－リンパ球によって媒介される急性および遅延型過敏症に関連した免疫応答；悪性貧血（アジソン病）；白血球血管外遊出を伴う疾患；中枢神経系（ＣＮＳ）炎症性障害；多臓器傷害症候群；溶血性貧血（それだけに限らないが、クリオグロブリン血症（cryoglobinemia）もしくはクームス陽性貧血を含む）；重症筋無力症；抗原－抗体複合体媒介性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質抗体症候群；アレルギー性神経炎；グレーブス病；Ｌａｍｂｅｒｔ－Ｅａｔｏｎ筋無力症症候群；水疱性類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫性多腺性内分泌障害；ライター病；スティッフマン症候群；ベーチェット病；巨細胞性動脈炎；免疫複合体性腎炎；ＩｇＡ腎症；ＩｇＭ多発ニューロパチー；免疫性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、または自己免疫性血小板減少症などがある。

【０１２３】

用語「結合」は、例えば、塩橋および水架橋などの相互作用を含めた、共有結合性、静電気的、疎水性、およびイオン性および／または水素結合相互作用に起因する２つの分子間の直接会合を指す。結合タンパク質には、例えば、本明細書で記載されるように、結合

剤を含む抗体および抗体代替物が含まれる。

【０１２４】

用語「クローン除去」は、自己反応性Ｔ細胞の除去（例えば、喪失または死）を指す。クローン除去は、胸腺内もしくは周辺内、または両方で主として実現され得る。

【０１２５】

本明細書全体にわたって、脈絡による別段の要求のない限り、単語「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、および「含む（comprising）」は、述べたステップもしくはエレメント、またはステップもしくはエレメントの群を含めることを暗示するが、任意の他のステップもしくはエレメント、またはステップもしくはエレメントの群の除外を暗示しないと理解されることになる。「からなる」とは、語句「からなる」に続くものを含み、それに限定されることを意味する。したがって、語句「からなる」は、列挙されたエレメントが要求され、または必須であり、他のエレメントはまったく存在し得ないことを示唆する。「から本質的になる」とは、語句の後に列挙された任意のエレメントを含むことを意味し、列挙されたエレメントについての開示で指定された活性または作用を妨害せず、またはそれに寄与しない他のエレメントに限定される。したがって、語句「から本質的になる」は、列挙されたエレメントが要求され、または必須であるが、他のエレメントは、必要に応じてであり、これらが列挙されたエレメントの活性または作用に実質的に影響するか否かに応じて存在する場合があり、または存在しない場合があることを示唆する。

【０１２６】

「連続プロセス」とは、プロセスの出発時点で適用され、プロセスの終点で終わる一定の機能によって定義され得るプロセスを意味する。したがって、本脈絡では、連続プロセスの一般的な例は、ある特定のタイプの体液、一般に血液が、一定流量（即ち、実質的に途切れない流れ）で患者から取り出され、また同様の一定流量で患者中に再導入される手順である。この手順は、体液が、一時点で１つの独立した手順で患者から引き抜かれ、別の時点で、バッチ式の様式で、必要に応じて貯蔵され、吸着剤と接触され、２つの最初の手順とほとんど無関係に選択されたさらに別の時点で患者中に再導入される任意の他の「不連続な」手順と対照的に理解されるべきである。

【０１２７】

用語「エンドトキシンを含まない」または「実質的にエンドトキシンを含まない」は一般に、せいぜい微量（例えば、被験体に対して臨床的に有害な生理的効果をまったく有さない量）のエンドトキシン、好ましくは検出不可能な量のエンドトキシンを含有する組成物、溶媒、および／または容器に関する。エンドトキシンは、細菌、一般にグラム陰性菌などのある特定の微生物に関連する毒素であるが、Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓなどのグラム陽性菌中に見つかる場合がある。最も普及しているエンドトキシンは、様々なグラム陰性菌の外膜中に見つかるリポ多糖（ＬＰＳ）またはリポオリゴ糖（ＬＯＳ）であり、これらは、これらの細菌が疾患を引き起こす能力において中心的な病原性の特徴を代表する。ヒトにおける少量のエンドトキシンは、他の有害な生理的効果の中でも、発熱、血圧の低下、ならびに炎症および凝血の活性化を生じさせ得る。

【０１２８】

したがって、医薬品生産では、少量でさえ、ヒトにおいて有害な作用を引き起こし得るので、ほとんどまたはすべての微量のエンドトキシンを薬物製品および／または薬物容器から除去することが望ましいことが多い。３００℃を超える温度が、ほとんどのエンドトキシンを分解するのに一般に要求されるので、デパイロジェネーションオーブン（depyrogenation oven）をこの目的に使用することができる。例えば、一次包装材、例えば、シリンジまたはバイアルなどに基づくと、２５０℃のガラス温度と３０分の保持時間の組合せは、多くの場合、エンドトキシンレベルの３桁の低減を実現するのに十分である。例えば、本明細書に記載の、かつ当技術分野で公知のクロマトグラフィーおよび濾過方法を含めた、エンドトキシンを除供する他の方法も企図されている。本発明の組成物中に存在するエンドトキシンのリスクを、排除しない場合、低減するために、哺乳動物細胞などの真

核細胞内でＨＲＳポリペプチドを産生させ、この細胞からこれらを単離する方法も含まれる。無血清の細胞内でＨＲＳポリペプチドを産生させ、この細胞からこれらを単離する方法が好適である。

【０１２９】

エンドトキシンは、当技術分野で公知の慣例的技術を使用して検出することができる。例えば、Ｌｉｍｕｌｕｓ　Ａｍｅｏｂｏｃｙｔｅ溶解産物アッセイは、カブトガニに由来する血液を利用し、エンドトキシンの存在を検出するのに非常に感度のよいアッセイである。この試験では、非常に低いレベルのＬＰＳが、カブトガニ溶解産物の検出可能な凝固を、この反応を増幅する強力な酵素カスケードに起因して引き起こすことができる。エンドトキシンは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって定量化することもできる。実質的にエンドトキシンを含まないために、エンドトキシンレベルは、約０．００１、０．００５、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０８、０．０９、０．１、０．５、１．０、１．５、２、２．５、３、４、５、６、７、８、９、または１０ＥＵ／ｍｇ未満のタンパク質であり得る。一般に、１ｎｇのリポ多糖（ＬＰＳ）は、約１～１０ＥＵに対応する。

【０１３０】

「エピトープ」は、抗体（もしくは同様のタンパク質）の可変領域、抗体代替物、結合剤、またはＴ細胞受容体と相互作用する結合相互作用を形成することができる抗原または他の巨大分子の部分を指す。抗体の場合では、このような結合相互作用は、ＣＤＲの１つまたは複数のアミノ酸残基との分子間接触として顕在化する。抗原結合は、ＣＤＲ３またはＣＤＲ３対を伴い得る。エピトープは、直鎖ペプチド配列（例えば、「連続的な」）であり得、または非連続的なアミノ酸配列（例えば、別個に、または一緒に、認識できる形状を形成することができる「コンフォメーショナル」または「不連続な」配列）から構成され得る。結合タンパク質は、１つまたは複数のアミノ酸配列を認識することができ、したがってエピトープは、１つを超える異なるアミノ酸配列を画定することができる。結合タンパク質によって認識されるエピトープは、当業者に周知のペプチドマッピングおよび配列分析技法によって求めることができる。「クリプティックエピトープ」または「クリプティック結合部位」は、曝露されていない、あるいは無修飾ポリペプチド、またはタンパク質複合体もしくは多量体内での認識から実質的に保護されているが、タンパク分解されたポリペプチド、または複合体形成していない解離したポリペプチドへの結合タンパク質によって認識され得るタンパク質配列のエピトープあるいは結合部位である。無修飾、多量体ポリペプチド構造中で曝露されていない、または部分的にのみ曝露されているアミノ酸配列は、潜在的なクリプティックエピトープである。エピトープが、曝露されていない、または部分的にのみ曝露されている場合、これは、ポリペプチドの内部に埋め込まれ、または他のタンパク質または因子の結合によってポリペプチド複合体中にマスクされている可能性がある。候補クリプティックエピトープは、例えば、無修飾ポリペプチドの３次元構造を検査することによって同定することができる。

【０１３１】

「発現コントロール配列」は、宿主細胞内のコード配列の転写もしくは翻訳、または細胞内位置もしくは細胞位置に影響する能力を有する、核酸または対応するアミノ酸の制御配列、例えば、プロモーター、リーダー、エンハンサー、イントロン、ＲＮＡまたはＤＮＡ結合タンパク質の認識モチーフ、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）、分泌シグナル、細胞内局在化シグナルなどである。例示的な発現コントロール配列は、Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology、１８５巻、Academic Press、San Diego、Calif.（１９９０年）に記載されている。

【０１３２】

用語「細胞外体液」は、哺乳動物生物の細胞外流体を指す。例としては、血液、腹水、血漿、リンパ、羊膜液、尿、唾液、および脳脊髄液がある。

【０１３３】

用語「異種」（heterologous）は、別の源に由来する、または同じ源に由来するが異なる（即ち、非天然の）コンテクストの中に位置した、生物（植物、動物、もしくは原核細胞など）、または核酸分子（染色体、ベクター、もしくは核酸コンストラクトなど）の中に導入された核酸またはタンパク質を指す。

【０１３４】

「相同性」は、同一であり、または保存的置換を構成するアミノ酸のパーセンテージ数を指す。相同性は、参照により本明細書に組み込まれているＧＡＰ（Deverauxら、１９８４年、Nucleic Acids Research、１２巻、３８７～３９５頁）などの配列比較プログラムを使用して求めることができる。このようにして、本明細書に引用されるものと同様の、または実質的に異なる長さの配列を、整列物中にギャップを挿入することによって比較することができ、このようなギャップは、例えば、ＧＡＰにより使用される比較アルゴリズムによって求められる。

【０１３５】

用語「半最大有効濃度」または「EC_{50}」は、本明細書に記載の作用物質（例えば、ＨＲＳポリペプチドまたは他の作用物質）の、これがいくらかの指定された曝露時間の後にベースラインと最大との中間の応答を誘導する濃度を指し、したがって、段階的な用量応答曲線のEC_{50}は、化合物の、その最大の効果の５０％が観察される濃度を表す。EC_{50}は、ｉｎ　ｖｉｖｏで最大効果の５０％を得るのに要求される血漿濃度も表す。同様に、「EC_{90}」は、作用物質または組成物の、その最大効果の９０％が観察される濃度を指す。「EC_{90}」は、「EC_{50}」およびヒル勾配から計算することができ、またはこれは、当技術分野における日常知識を使用して、データから直接求めることができる。いくつかの実施形態では、抗体ブロッキング剤のEC_{50}は、約０．０１、０．０５、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、または５００ｎＭ未満である。いくつかの実施形態では、生物治療用組成物は、約１ｎＭ以下のEC_{50}値を有することになる。

【０１３６】

本発明の「免疫原性組成物」は、本明細書において使用する場合、哺乳動物などの動物において免疫応答を誘発する任意の組成物を指す。「免疫応答」は、異物に対する体の反応であって、このような反応の生理学的または病的結果を暗示しない、即ち、必ずしも動物に対する防御免疫を付与することのない、反応である。免疫応答は、以下、即ち、（ａ）抗原への曝露に応答して、胸腺によってリンパ球（Ｔ細胞）が産生される細胞性免疫反応、および／または（ｂ）抗原曝露とその後の抗体産生に応答して血漿リンパ球（Ｂ細胞）を産生する体液免疫応答の１つまたは複数を含み得る。

【０１３７】

「単離された」とは、その天然状態においてそれに通常付随する成分を実質的または本質的に含まない材料を意味する。例えば、「単離ペプチド」または「単離ポリペプチド」などは、本明細書において使用する場合、ペプチドまたはポリペプチド分子の、その天然の細胞環境からの、かつ細胞の他の成分との会合からのｉｎ　ｖｉｔｒｏでの単離および／または精製を含み、即ち、これは、ｉｎ　ｖｉｖｏ物質と有意に関連していない。

【０１３８】

用語「調節すること」は、一般に、対照と比較して統計的に有意な、または生理学的に有意な量で「増大させること」、「増強すること」、または「刺激すること」、および「減少させること」または「低減すること」を含む。「増大した」、「刺激された」、または「増強された」量は、一般に「統計的に有意な」量であり、組成物なし（例えば、本発明のＨＲＳポリペプチドがいずれも存在しない中で）または対照の組成物、試料、もしくは試験被験体によって生じる量の１．１、１．２、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、３０倍、またはそれ以上（例えば、５００、１０００倍）（中間のすべての整数および小数点、ならびに１超、例えば、１．５、１．６、１．７．１．８などを

含む）である増大を含むことができる。「減少した」または「低減された」量は、一般に「統計的に有意な」量であり、組成物なし（作用物質もしくは化合物が存在しない）、または対照組成物によって生じる量の１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％の減少を含むことができ、中間のすべての整数を含む。

【０１３９】

用語「作動可能に連結した」、「作動可能に連結した」、または「作動可能にカップリングした」は、本明細書で互換的に使用する場合、２種以上のヌクレオチド配列または配列エレメントの、これらがその意図された様式で機能することを可能にする様式での適所配置を指す。いくつかの実施形態では、本発明による核酸分子は、組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結した、クロマチンを開き、かつ／または開いた状態のクロマチンを維持することができる１つまたは複数のＤＮＡエレメントを含む。他の実施形態では、核酸分子は、（ａ）翻訳を増大させることができるヌクレオチド配列、（ｂ）細胞外での組換えタンパク質の分泌を増大させることができるヌクレオチド配列、（ｃ）ｍＲＮＡ安定性を増大させることができるヌクレオチド配列、および（ｄ）転写または翻訳を調節するためにトランス作用因子に結合することができるヌクレオチド配列から選択される１種または複数種のＤＮＡまたはＲＮＡヌクレオチド配列をさらに含むことができ、このようなヌクレオチド配列は、組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結している。必ずしもそうではないが、一般に、作動可能に連結したヌクレオチド配列は、連続しており、必要な場合、読み枠内にある。しかし、クロマチンを開き、かつ／または開いた状態のクロマチンを維持することができる作動可能に連結したＤＮＡエレメントは、一般に、組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列の上流に位置しているが、これは、必ずしもそのヌクレオチド配列と連続していない。様々なヌクレオチド配列の作動可能な連結は、例えば、ＰＣＲ方法を使用して、当業者に周知の組換え法によって、適当な制限部位でのライゲーションによって、またはアニーリングによって達成される。適当な制限部位が存在しない場合、従来の慣行を踏まえて、合成オリゴヌクレオチドリンカーまたはアダプターを使用することができる。

【０１４０】

「非カノニカルな」活性は、本明細書において使用する場合、一般に、ｉ）インタクトな天然の全長親タンパク質がいずれの有意な程度にも持たない、本発明のＨＲＳポリペプチドが持つ新しい非アミノアシル化生物活性、またはｉｉ）インタクトな天然の全長親タンパク質が持っていた活性のいずれかを指し、この場合、ＨＲＳポリペプチドは、ａ）インタクトな天然の全長親タンパク質と比較して、非カノニカル活性が有意により高い（例えば、少なくとも２０％超）比活性、またはｂ）古典的な細胞質の細胞内コンパートメントと比較して、例えば、インタクトな天然の全長親タンパク質が持つ他の活性から活性を単離することによる新しいコンテクストでの、もしくは細胞外環境のコンテクストでの活性のいずれかを呈する。

【０１４１】

「プロモーター」は、細胞内でＲＮＡポリメラーゼに結合し、下流の（３’方向）コード配列の転写を開始することができるＤＮＡ制御配列である。本明細書において使用する場合、プロモーター配列は、転写開始部位によってその３’末端で結合されており、上流（５’方向）に延在して、バックグラウンドより上の検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含む。転写開始部位（好都合なことには、ヌクレアーゼＳ１を用いたマッピングによって画定される）は、プロモーター配列、およびＲＮＡポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）内で見つけることができる。真核生物プロモーターは、多くの場合、しかし常にではなく、「ＴＡＴＡ」ボックスおよび「ＣＡＴ」ボックスを含有することができる。原核生物プロモーターは、－１０および－３５コンセンサス配列に加えて、Ｓｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ配

列を含有する。

【０１４２】

様々な異なる源に由来する構成的、誘導性、および抑制性プロモーターを含めた多数のプロモーターが当技術分野で周知である。代表的な源としては、例えば、ウイルス、哺乳動物、昆虫、植物、酵母、および細菌性細胞型があり、これらの源に由来する適当なプロモーターは、容易に入手可能であり、あるいはオンラインで、または例えば、ＡＴＣＣなどの受託機関、および他の商業的供給元もしくは個々の源から公的に入手可能な配列に基づいて合成的に作製することができる。プロモーターは、単方向的（即ち、一方向で転写を開始する）であっても、双方向的（即ち、３’または５’方向で転写を開始する）であってもよい。プロモーターの非限定例としては、例えば、Ｔ７細菌発現系、ｐＢＡＤ（ａｒａＡ）細菌発現系、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＲＳＶプロモーターがある。誘導プロモーターとしては、Ｔｅｔ系（米国特許第５，４６４，７５８号および同第５，８１４，６１８号）、Ｅｃｄｙｓｏｎｅ誘導系（Noら、Proc. Natl. Acad. Sci.（１９９６年）９３巻（８号）：３３４６～３３５１頁）；Ｔ－ＲＥ$_x$（商標）系（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）、ＬａｃＳｗｉｔｃｈ（登録商標）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、ならびにＣｒｅ－ＥＲ^{T}タモキシフェン誘導性リコンビナーゼ系（Indraら、Nuc. Acid. Res.（１９９９年）２７巻（２２号）：４３２４～４３２７頁；Nuc. Acid. Res.（２０００年）２８巻（２３号）：ｅ９９頁；米国特許第７，１１２，７１５号；およびKramer & Fussenegger、Methods Mol. Biol.（２００５年）３０８巻：１２３～１４４頁）、または所望の細胞内での発現に適した当技術分野で公知の任意のプロモーターがある。

【０１４３】

ある特定の実施形態では、組成物中の任意の所与の作用物質（例えば、ＨＲＳポリペプチド）の「純度」は、具体的に定義することができる。例えば、ある特定の組成物は、例えば、かつ決して限定的ではなく、化合物を分離、同定、および定量化するのに生化学および分析化学において頻繁に使用されるカラムクロマトグラフィーの周知の形態である高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって測定した場合、中間のすべての少数を含めて、少なくとも８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％純粋である作用物質を含むことができる。

【０１４４】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマー、ならびにこのポリマーのバリアントおよび合成類似体を指すのに本明細書で互換的に使用する。したがって、これらの用語は、１つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の化学的類似体などの合成の天然に存在しないアミノ酸であるアミノ酸ポリマー、および天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。

【０１４５】

用語「予後」は、疾患の例えば、再発、フレアリング、および薬物耐性を含めた、疾患症状の可能性の予測を指すのに本明細書で使用する。用語「予測」は、被験体または患者が、薬物または薬物のセット、例えば、ＨＲＳポリペプチドまたは他の作用物質に対して有利または不利に応答する可能性を指すのに本明細書で使用する。一実施形態では、予測は、これらの応答の程度に関する。一実施形態では、予測は、疾患を再発することなく、処置、例えば、特定の治療剤を用いた処置の後に、かつある特定の期間にわたって患者が生存または改善するか否か、および／またはその確率に関する。本発明の予測方法は、任意の特定の患者について最も適切な処置モダリティーを選択することによって、処置を決定するのに臨床的に使用することができる。本発明の予測方法は、患者が、例えば、所与の治療剤もしくは組合せの投与、外科的介入、ステロイド処置などを含めた所与の治療レジメンなどの治療レジメンに対して有利に応答する可能性があるか否か、または治療レジメンの後の患者の長期間生存の可能性があるか否かを予測するのに有益なツールである。

【０１４６】

「患者亜集団」、または代わりに「被験体亜集団」、およびその文法的なバリエーショ

ンは、本明細書において使用する場合、患者サブセットであって、これが属するより広い疾患カテゴリーにおいて、患者または被験体サブセットを他のサブセットと区別する１つまたは複数の独特の測定可能および／または識別可能な特性を有するとして特徴付けられる、患者サブセットを指す。このような特性としては、疾患サブカテゴリー、性別、生活様式、既往歴、関与された臓器／組織、処置歴などがある。一実施形態では、患者または被験体亜集団は、自己抗体レベルによって特徴付けられる。

【０１４７】

「患者応答」または代わりに「被験体応答」は、限定することなく、（１）減速および完全な抑止を含めた疾患進行のある程度の阻害；（２）疾患エピソードおよび／または症状の数の低減；（３）病変サイズの低減；（４）隣接する周辺臓器および／または組織内への疾患細胞浸潤の阻害（即ち、低減、減速、または完全な停止）；（５）病害拡大の阻害（即ち、低減、減速、または完全な停止）；（６）疾患病変部の退縮または切除をもたらし得るが、そうなる必要はない自己免疫応答の減少；（７）障害に関連した１つまたは複数の症状のある程度の緩和；（８）処置後の無病提示の長さの増大；および／または（９）処置後の所与の時点での死亡率の減少を含めた、患者への利益を示唆する任意のエンドポイントを使用して評価することができる。

【０１４８】

用語「特異的な」は、特異的結合対の一方のメンバーが、その特異的結合パートナー（複数可）以外の分子へのいずれの有意な結合も示さない状況に適用可能である。この用語は、例えば、抗原結合ドメインが、いくつかの抗原が担持する特定のエピトープに特異的である場合にも適用可能であり、この場合では、抗原結合ドメインを担持する特異的結合メンバーは、そのエピトープを担持する様々な抗原に結合することができる。

【０１４９】

「統計的に有意な」とは、結果が偶然起こったとは考えにくかったことを意味する。統計的有意性は、当技術分野で公知の任意の方法によって求めることができる。有意性の一般に使用される尺度としては、ｐ－値があり、これは、帰無仮説が真である場合に、観察されるイベントが起こる頻度または確率である。得られたｐ－値が有意水準より小さい場合、帰無仮説は棄却される。単純な場合では、有意水準は、０．０５以下のｐ－値で定義される。

【０１５０】

用語「溶解度」は、液体溶媒中に溶解し、均一溶液を形成する、本明細書に提供される抗体ブロッキング剤の性質を指す。溶解度は一般に、溶媒の単位体積当たりの溶質の質量（溶媒１ｋｇ当たりの溶質のｇ、１ｄＬ（１００ｍＬ）当たりのｇ、ｍｇ／ｍｌなど）、容積モル濃度、重量モル濃度、モル分率、または濃度の他の同様の記述のいずれかによる濃度として表現される。溶媒の量当たりに溶解し得る溶質の最大平衡量が、温度、圧力、ｐＨ、および溶媒の性質を含む指定条件下でのその溶媒中のその溶質の溶解度である。ある特定の実施形態では、溶解度は、生理的ｐＨ、または他のｐＨ、例えば、ｐＨ５．０、ｐＨ６．０、ｐＨ７．０、もしくはｐＨ７．４で測定される。ある特定の実施形態では、溶解度は、水、またはＰＢＳもしくはＮａＣｌ（ＮａＰの有無にかかわらず）などの生理的緩衝液中で測定される。特定の実施形態では、溶解度は、相対的により低いｐＨ（例えば、ｐＨ６．０）および相対的により高い塩（例えば、５００ｍＭのＮａＣｌおよび１０ｍＭのＮａＰ）で測定される。ある特定の実施形態では、溶解度は、血液または血清などの生体液（溶媒）中で測定される。ある特定の実施形態では、温度は、約室温（例えば、約２０、２１、２２、２３、２４、２５℃）または約体温（３７℃）であり得る。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、室温または３７℃で少なくとも約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００ｍｇ／ｍｌの溶解度を有する。

【０１５１】

「被験体」には、本明細書において使用する場合、本発明のＨＲＳポリペプチドまたは抗体ブロッキング剤で処置または診断することができる、症状を呈し、または症状を呈するリスクのある任意の動物が含まれる。適当な被験体（患者）としては、実験動物（マウス、ラット、ウサギ、もしくはモルモットなど）、家畜、および家庭動物またはペット（ネコまたはイヌなど）がある。非ヒト霊長類、および好ましくは、ヒト患者が含まれる。

【０１５２】

「実質的に」または「本質的に」は、ほぼ全体的にまたは完全に、を意味し、例えば、いくらかの所与の量の９５％以上を意味する。

【０１５３】

「治療応答」は、治療応答の投与（寛容が誘導されるか否かを問わず）に基づいた症状の改善（持続的であるか否かを問わず）を指す。

【０１５４】

用語「寛容」は、その他は実質的に正常な免疫系の状況で、抗原（例えば、自己抗原）に対する免疫系の持続的（例えば、１カ月以上）、特異的な低減された応答性を指す。寛容は、免疫応答のＢ細胞媒介性免疫応答などのすべて、またはクラスのクラスのすべてが減少される全般的な免疫抑制と異なる。「寛容化」は、寛容の状態に導くプロセスを指す。

【０１５５】

本明細書において使用する場合、用語「治療有効量」、「治療用量」、「予防有効量」、または「診断有効量」は、投与後に所望の生物学的応答を誘発するのに必要とされる薬物、例えば、ＨＲＳポリペプチドまたは抗体の量である。同様に、用語「ＨＲＳポリペプチド療法」は、最低限有効な治療レベルの上に患者の血漿中のＨＲＳポリペプチドの平均定常状態濃度を維持する療法を指す。

【０１５６】

「処置」または「処置すること」は、本明細書において使用する場合、疾患または状態の症状または病理に対する任意の効果を含み、処置されている疾患または状態の１種または複数種の測定可能なマーカーの最小の変化または改善さえ含み得る。「処置」または「処置すること」は、必ずしも、疾患もしくは状態、またはその付随した症状の完全な根絶または治癒を示唆しない。この処置を受けている被験体は、それを必要とする任意の被験体である。臨床的な改善の例示的なマーカーは、当業者に明らかとなる。

【０１５７】

用語「ワクチン」は、本明細書において使用する場合、ワクチンまたは同時投与される抗原に対して防御免疫反応を誘発する（illicit）ように動物に投与され得る任意の組成物を広く指す。用語「防御する」、「防御免疫反応」、または「防御免疫」は、本明細書において、ワクチン抗原を特異的に認識する抗体または細胞系の発生を記述する。

【０１５８】

用語「ベクター」、「クローニングベクター」、および「発現ベクター」は、ＤＮＡまたはＲＮＡ配列（例えば、異種遺伝子）を宿主細胞内に導入することができ、その結果、宿主を形質転換し、導入された配列の発現（例えば、転写および翻訳）を促進するビヒクルを意味する。ベクターとして、プラスミド、ファージ、ウイルスなどを挙げることができ、以下でより詳細に論じる。

【０１５９】

別段の定義のない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様の、または等価な任意の方法、組成物、試薬、細胞を、本発明の実践または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が本明細書に記載されている。本明細書に引用した、それだけに限らないが、特許および特許出願を含めたすべての刊行物および参考文献は、各個々の刊行物および参考文献が、完全に示されているとして本明細書に参照により組み込まれていることが具体的かつ個々に示されているように、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。本願が優先権を主張する任意の

特許出願も、刊行物および参考文献について上述した様式で、その全体が本明細書に参照により組み込まれている。

【０１６０】

概要

本発明は、炎症疾患および自己免疫疾患を処置するための改善された治療用組成物、診断、および方法の開発に関し、いくつかの態様では、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体、関連タンパク質、および他の抗体の発生に関連した肺疾患を含めた、炎症性筋疾患、ならびに関連疾患および障害の処置に関する。

【０１６１】

本発明は、処置しなければ疾患進行を悪化させ、永続させ、または推進し、無関係の遺伝的な欠陥または傷害によって引き起こされ得る、二次炎症成分を有する疾患を処置するための改善された治療用組成物、診断、および方法の開発も含む。

【０１６２】

いくつかの態様では、このような処置は、処置の既存方法と比べて改善された効力をもたらし、著しく改善された副作用プロファイルを呈する。

【０１６３】

「炎症」は一般に、有害な刺激、例えば、病原体、損傷細胞（例えば、創傷）、および刺激物などに対する組織の生物学的応答を指す。用語「炎症反応」は、単に例として、本明細書に記載および当技術分野で公知のものの中でも、免疫細胞活性化または遊走、サイトカイン産生や、キニン放出、線維素溶解、および凝血を含めた血管拡張を含めた、炎症が実現および制御される特定の機構を指す。

【０１６４】

慢性炎症の臨床徴候は、疾病の持続時間、炎症性病変、原因、および影響を受けた解剖学的な範囲に依存する。（例えば、Kumarら、Robbins Basic Pathology－８版、２００９年、Elsevier、London；Miller, LM、Pathology Lecture Notes、Atlantic Veterinary College、Charlottetown、PEI、カナダを参照）。慢性炎症は、例えば、本明細書に記載および当技術分野で公知のものの中でも、自己免疫、アレルギー、アルツハイマー病、貧血、大動脈弁狭窄、関節炎、例えば、関節リウマチおよび骨関節炎など、がん、うっ血性心不全、線維筋痛症、線維症、心発作、腎不全、ループス、膵炎、脳卒中、外科合併症、炎症性肺疾患、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、神経学的障害、糖尿病、代謝異常、肥満、ならびに乾癬を含めた、様々な病理学的状態または疾患に関連する。したがって、ＨＲＳポリペプチドを使用して、慢性炎症を処置もしくは管理し、個々の慢性炎症反応の１つもしくは複数のいずれかを調節し、または急性もしくは慢性炎症に関連した任意の１つもしくは複数の疾患もしくは状態を処置することができる。

【０１６５】

鑑別診断を行う目的のため、およびまた、例えば、承認された臨床基準に従って改善を判定することによって、処置の過程で治療有効用量が投与されたか否かを判定することなどの、処置を監視するためを含めた、炎症状態および他の状態の徴候および症状を評価するための基準は、当業者に明らかとなり、例えば、Berkowら編、The Merck Manual、１６版、Merck and Co.、Rahway、N.J.、１９９２年；Goodmanら編、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、１０版、Pergamon Press, Inc.、Elmsford、N.Y.、（２００１年）；Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics、３版、ADIS Press, Ltd.、WilliamsおよびWilkins、Baltimore、MD.（１９８７年）；Ebadi、Pharmacology、Little, Brown and Co.、Boston、（１９８５年）；Osolciら編、Remington's Pharmaceutical Sciences、１８版、Mack Publishing Co.、Easton、PA（１９９０年）；Katzung、Basic and Clinical Pharmacology、Appleton and Lange、Norwalk、CT（１９９２年）の教示によって例示されている。

【０１６６】

したがって、いくつかの態様は、組織炎症を低減する方法であって、それを必要とする

被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法を含む。いくつかの実施形態では、組織は、筋肉、肺、および皮膚から選択される。

【０１６７】

ある特定の態様は、自己免疫疾患に関連した筋肉炎症または肺炎症を低減する方法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法を含む。

【０１６８】

自己抗体に関連した疾患を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞、またはｄ）自己抗体に特異的な抗体もしくは結合タンパク質の１種または複数を含む治療用組成物を投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含む、方法も含まれる。

【０１６９】

いくつかの態様は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）抗原に対する寛容を誘導する方法であって、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、組成物を投与すると、自己抗原に対する寛容化が引き起こされる、方法を含む。

【０１７０】

ある特定の態様は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する自己免疫応答に関与するＴ細胞のセットまたはサブセットを低減または排除するための方法であって、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、組成物を投与すると、自己反応性Ｔ細胞のクローン除去が引き起こされる、方法を含む。

【０１７１】

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する自己免疫応答に関与するＴ細胞内でアネルギーを誘導するための方法であって、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、組成物を投与すると、自己免疫応答に関与するＴ細胞の機能的不活化が引き起こされる、方法も含まれる。これらの実施形態および関連実施形態のいくつかは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素「自己抗原活性化Ｔ細胞」および／またはヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素「自己抗原活性化Ｂ細胞」の存在またはレベルを低減する方法を含む。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、自己抗体に関連した疾患を有する被験体は、自己免疫疾患または障害に対する遺伝性素因を有する。例えば、ある特定の実施形態では、被験体は、ＭＨＣクラスＩＩアロタイプ、例えば、ＨＬＡ　ＤＲ２、ＨＬＡ　ＤＲ３、ＨＬＡ　ＤＲ４など、タンパク質チロシンホスファターゼ中の変異、非受容体タイプ２２（ＰＴＰＮ２２）、ならびに生得免疫系およびＴＮＦ超遺伝子ファミリーの病原体認識受容体などの経路のディスレギュレーションを有し（例えば、ＲａｉおよびWakeland、Semin. Immunology

.、２３巻：６７～８３頁、２０１１年を参照）、これらのそれぞれは、ある特定の自己免疫障害に相関していた。

【０１７３】

いくつかの態様は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患を処置するための補充療法であって、それを必要とする被験体に、ａ）ＨＲＳポリペプチド、ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞、またはｄ）自己抗体に特異的な抗体もしくは結合タンパク質の１種または複数を含む治療用組成物を投与するステップを含み、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足を機能的に補償する、補充療法を含む。

【０１７４】

いくつかの補充療法では、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足は、抗Ｊｏ－１抗体の存在によって引き起こされる。この補充療法のいくつかの態様では、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足は、内因性ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素中の変異によって引き起こされ、これは、内因性ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の活性、発現、または細胞分布を調節する。いくつかの態様では、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足は、ペロー症候群またはアッシャー症候群に関連する。いくつかの態様では、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足は、組織内、または傷害もしくは炎症の部位におけるヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不十分な局所的産生に関連する。ある特定の態様では、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足は、横紋筋融解症、悪液質、および／または筋傷害の１つまたは複数に関連する。

【０１７５】

用語「寛容」は、本明細書において使用する場合、哺乳動物、特にヒトにおける特定の抗原に対する免疫応答の持続的低減または非存在を指す。寛容は、免疫応答の、Ｂ細胞媒介性免疫応答などの免疫細胞のすべてまたは特定クラスのすべてが減少または排除される全般的な免疫抑制と異なる。寛容の発生は、処置用ＨＲＳポリペプチドを単回または連続用量で投与した後の、宿主被験体の血清中のＨＲＳポリペプチドに対する抗体の濃度の非存在または減少によって日常的に監視することができる。寛容が発生すると一般に、患者における自己免疫疾患の症状が減少するのに十分となり、例えば、患者は、一般的な免疫抑制剤、例えば、コルチコステロイドの非存在下、または低減された量の存在下で正常な活性を維持するように十分に改善され得る。

【０１７６】

これらの方法または組成物のいずれにおいても、寛容は、一般に持続的となり、これが約１カ月、約２カ月、約３カ月、約４カ月、約５カ月、もしくは約６カ月、またはそれ以上の持続時間を有することになることを意味する。寛容は、選択的なＢ細胞アネルギー、もしくはＴ細胞アネルギー、または両方をもたらし得る。

【０１７７】

これらの方法、処置、および治療用組成物のいずれにおいても、用語「ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患」は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する抗体が、他の自己抗体も検出されるか否かに関係なく検出され、もしくは検出可能であり、または疾患の進行もしくは原因に役割を果たすと考えられる任意の疾患または障害を指す。患者試料中の抗体を検出するための方法は、例えば、ＲＩＡ、ＥＬＩＳＡによるもの、免疫沈降によるもの、組織もしくは細胞（トランスフェクション細胞を含む）の染色、抗原マイクロアレイ、質量スペクトル分析、特異的中和アッセイ、または所望の抗原特異性を同定するためのいくつかの当技術分野で公知の他の方法の１つによるものを含めた、任意の標準手順によって実施することができる。いくつかの態様では、抗体特異性は、抗体がヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の様々なスプライスバリアント、およびトランケート型もしくはタンパク質分解型に選択的に結合する能力を判定することによってさらに特徴付けることができる。ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する比較的周知のヒト自己抗体としては、例えば、Ｊｏ－１に対する抗体がある。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対

する自己抗体に関連した疾患と特異的に交差反応する、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に由来するエピトープを含む。主張した方法、および組成物のいずれかのいくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己反応性Ｔ細胞に関連した疾患と特異的に交差反応する、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に由来するエピトープを含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、別のｔＲＮＡ合成酵素または非ｔＲＮＡ合成酵素自己抗体のいずれかに対する自己抗体に関連した疾患と特異的に交差反応するエピトープを含む。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体に関連した疾患を有する患者の血清に由来する抗体の大部分によって特異的に認識される免疫優性エピトープを含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体に関連した疾患を有する患者の血清に由来する自己反応性Ｔ細胞の大部分によって特異的に認識される免疫優性エピトープを含む。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、エピトープは、ＨＲＳポリペプチドのＷＨＥＰドメイン（配列番号１のおよそアミノ酸１～４３）；アミノアシル化ドメイン（配列番号１のおよそアミノ酸５４～３９８）；もしくはアンチコドン結合ドメイン（配列番号１のおよそアミノ酸４０６～５０１）、またはこれらの任意の組合せの中に構成されている。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体に関連した疾患と特異的に交差反応するエピトープを含まない。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、最大約１×１０$^{-7}$Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、最大約５×１０$^{-7}$Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、最大約１×１０$^{-6}$Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない。

【０１８２】

したがって、いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、競合性ＥＬＩＳＡで測定される場合、野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（配列番号１）より疾患関連自己抗体に対する親和性が低い。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、野生型ヒト（配列番号１）に対する疾患関連自己抗体の親和性より、少なくとも約１０分の１低い、または少なくとも約２０分の１低い、または少なくとも約５０分の１低い、または少なくとも約１００分の１低い疾患関連自己抗体に対する見かけ上の親和性を有する。いくつかの態様では、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体は、Ｊｏ－１抗原に向けられている。

【０１８３】

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患（およびヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患）の例としては、限定することなく、自己免疫疾患、炎症疾患、ならびに炎症性筋疾患、多発性筋炎、スタチン誘導性ミオパチー、皮膚筋炎を含めた炎症性筋疾患、間質性肺疾患（および他の肺線維症状態）、ならびに多発性筋炎－強皮症オーバーラップおよび封入体筋炎（ＩＢＭ）などの関連障害、ならびに例えば、間質性肺疾患、関節炎、食道運動障害、心血管疾患、およびレイノー現象などの他の血管所見を含めた抗合成酵素症候群において見つかるものなどの状態があり、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患の他の例としては、アッシャー症候群およびペロー症候群を含めた活性ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不足をもたらす遺伝子障害がある。ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足の疾患のさらなる例としては、組織内の、または傷害もしくは炎症の部位におけるヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不十分な局所的産生に

関連した炎症疾患および障害がある。いくつかの態様では、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足は、横紋筋融解症、悪液質、および／または筋傷害の１つまたは複数に関連する。

【０１８４】

ある特定の実施形態では、抗（ant）ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の結合、作用、または産生を遮断することによって、本明細書に記載の組成物および方法は、抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体、他の自己抗体に関連した、広い範囲の自己免疫性および炎症性の疾患および障害、ならびにヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足に関連した疾患を処置する有用性を有する。

【０１８５】

さらに、本発明のＨＲＳポリペプチドを投与すると、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の濃度を回復することによって（抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の非存在下で）、局所的な炎症反応を調節することができ、これらは、広い範囲の炎症疾患および障害、ならびに例えば、筋ジストロフィーの場合と同様に、原発性疾患に続発する炎症における疾患の処置の両方において有効である。

【０１８６】

ある特定の実施形態は、筋炎を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法を含む。いくつかの実施形態では、筋炎は、多発性筋炎である。いくつかの実施形態では、筋炎は、皮膚筋炎である。

【０１８７】

いくつかの実施形態は、封入体筋炎（ＩＢＭ）を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法を含む。

【０１８８】

若年性筋炎を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法も含まれる。

【０１８９】

ある特定の実施形態は、スタチン誘導性ミオパチーを処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法を含む。いくつかの実施形態では、スタチンは、セリバスタチンである。

【０１９０】

いくつかの実施形態は、間質性肺疾患（ＩＬＤ）を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法を含む。

【０１９１】

ある特定の実施形態は、アッシャー症候群を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法を含む。ある特定の実施形態は、１型アッシャー症候群を処置する方法を含む。いくつかの実施形態は、２型アッシャー症候群を処置する方法を含む。ある特定の実施形態は、３型アッシャー症候群を処置する方法を含む。

【０１９２】

いくつかの実施形態は、ペロー症候群（ＰＳ）を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法を含む。

【０１９３】

筋ジストロフィーを処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法も含まれる。いくつかの態様では、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、および先天型筋ジストロフィーから選択される。

【０１９４】

悪液質を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法も含まれる。

【０１９５】

横紋筋融解症を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、ｉ）ＨＲＳポリペプチド、ｉｉ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、またはｉｉｉ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法も含まれる。

【０１９６】

ある特定の例示的な炎症性障害または自己免疫障害を以下により詳細に記載する。

【０１９７】

多発性筋炎は、体の両側の骨格筋（運動を行うことに関与）に影響する。これは、年齢１８未満の人でまれにみられ、ほとんどの場合は、３１～６０の年齢の間の人においてである。上記に列挙した症状に加えて、進行性筋力低下により、嚥下困難、発話困難、座位から立ち上がることの困難、階段を登ることの困難、物体を持ち上げることの困難、または手を頭上に伸ばすことこと（reaching overhead）の困難がもたらされる。多発性筋炎を有する人は、関節炎、息切れ、および心臓不整脈も経験し得る。

【０１９８】

皮膚筋炎は、進行性筋力低下に先行し、または伴う皮膚発疹によって特徴付けられる。発疹は、紫色または赤色の変色を伴って斑状に見え、眼瞼、ならびに指関節、肘、膝、およびつま先を含めた関節を延ばし、またはまっすぐにするのに使用される筋肉上に特徴的に発生する。赤色発疹は、顔、首、肩、上胸部、背中、および他の位置上にも起こり得、患部に腫脹が存在する場合がある。発疹は、時折明らかな筋病変を伴わないで起こる。皮膚筋炎を有する成人は、体重減少または微熱を経験する場合があり、炎症を起こした肺を有する場合があり、光に敏感であり得る。成人皮膚筋炎は、多発性筋炎と異なり、乳房、肺、女性器、または腸の腫瘍に付随し得る。皮膚筋炎を有する小児および成人は、カルシウム沈着を生じさせる場合があり、これは、皮膚の下、または筋肉内に硬い隆起として現れる（石灰沈着と呼ばれる）。石灰沈着は、ほとんどの場合、疾患を発症して１～３年で起こるが、何年も後に起こる場合がある。これらの沈着は、成人で始まる皮膚筋炎より小児期の皮膚炎においてより頻繁にみられる。皮膚筋炎は、コラーゲン血管疾患または自己免疫疾患と関連している場合がある。

【０１９９】

多発性筋炎ならびに皮膚筋炎のいくつかの場合では、遠位筋（前腕中、ならびに足首および手首の周囲のものなどの体の胴体から離れた）が、疾患が進行するにつれて影響され得る。多発性筋炎および皮膚筋炎は、コラーゲン血管疾患または自己免疫疾患に関連して

いる場合がある。多発性筋炎は、感染性障害にも関連している場合がある。

【０２００】

封入体筋炎（ＩＢＭ）は、進行性筋力低下および消耗によって特徴付けられる。筋力低下の発症は、一般に段階的であり（数カ月または数年にわたる）、近位筋および遠位筋の両方に影響する。筋力低下は、体の片側のみに影響し得る。空胞と呼ばれる小さい穴が、筋繊維の細胞内に時折見られる。転倒およびつまずきが通常、ＩＢＭの最初の顕著な症状である。何人かの個体については、障害は、手首および指の脱力とともに始まり、それは、つまむこと、ボタンを掛けること、および物体を掴むことを困難にする。手首および指の筋肉の脱力、ならびに前腕筋および脚の四頭筋の萎縮（筋肉量の低下または喪失）がある場合がある。嚥下困難は、ＩＢＭ症例のおよそ半分で起こる。疾患の症状は通常、５０の年齢の後に始まるが、この疾患は、より早く起こる場合がある。多発性筋炎および皮膚筋炎と異なり、ＩＢＭは、女性より男性において頻繁に起こる。

【０２０１】

若年性筋炎は、成人皮膚筋炎および多発性筋炎といくつかの類似性を有する。これは一般に、近位筋力低下および炎症、浮腫（腫張を引き起こす体組織内の流体の異常なコレクション）、筋痛、疲労、皮膚発疹、腹痛、発熱、ならびに拘縮（関節が自由に動くことを妨げる、筋腱内の炎症によって引き起こされる、関節周囲の筋肉または腱の慢性短縮）を含む症状を伴って、年齢２～１５歳の小児に影響する。若年性筋炎を有する小児は、嚥下困難および呼吸困難も有する場合があり、心臓が影響される場合がある。若年性皮膚筋炎を有する小児のおよそ２０～３０パーセントが石灰沈着を生じさせる。影響された小児は、その血液中で正常より高いレベルの筋肉酵素クレアチンキナーゼを示さない場合があるが、正常より高いレベルの他の筋肉酵素を有する。

【０２０２】

スタチン誘導性ミオパチーは、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル補酵素Ａ還元酵素（ＨＭＧＣＲ）の阻害を介して作用するスタチンの長期間使用に関連する。一般に耐容性良好である、これらの医薬品は、筋毒性の誘導因子として記載されている。より最近、薬物を停止した後でさえスタチンミオパチーが持続する患者が報告されており、これらの報告は、自己免疫原因を有すると仮定されている。スタチンの利益は、冠動脈性心疾患のリスクおよび冠状動脈アテローム性硬化症の進行を低減することにおいて誰もが認めている。それでもやはり、関連した合併症は、生命を危うくする場合がある。米国において３８００万人超がスタチンを服用していると現在推定されており、これらの最大７％（２６０万超）が筋肉症状を生じさせ、これらの最大０．５％（１９０，０００超）が、生命を危うくするミオパチーを潜在的に続いて生じさせると予測されている。

【０２０３】

すべてのスタチンが筋肉問題を引き起こし得、リスクは、これらの親油性、コレステロール低下効力、および投与量の増大とともに増大する。セリバスタチンは特に、より高いリスクがあるとして関係づけられており、これは、米国市場から回収された。残りのスタチンのうちで、アトルバスタチンおよびシムバスタチンは、より高い筋毒性率を有する。他の非スタチン脂質低下剤、例えば、ナイアシンおよびフィブレートなども、特にスタチンと組み合わされたとき、筋肉問題のリスクを持つ。どの患者がスタチン誘導性筋肉問題を有することになるかを予測することは可能でないが、事前の筋肉問題は、リスクファクターとなり得、スタチン処置を開始する際に考慮されるべきである。ミオパチーの家族歴は、患者が遺伝性ミオパチーのキャリアであり得る場合該当し、その理由は、これは、スタチン処置の加えられたストレスによって明らかにされ得るためである。他のリスクファクターとして、８０歳超の年齢、低体重、女性、甲状腺機能低下症、ある特定の遺伝的欠陥、およびアジア系、ならびにカルシウムチャネル遮断薬、マクロライド抗生物質、オメプラゾール、アミオダロン、アゾール抗真菌薬、ヒスタミンH_2受容体アンタゴニスト、ネファゾドン、シクロスポリン、ＨＩＶプロテアーゼ阻害剤、ワルファリン、およびグレープフルーツジュースを含めたある特定の医薬品の同時使用を挙げることができる。

【０２０４】

スタチンによって引き起こされる最も一般的な筋肉症状は、筋痛または筋肉痛であり、これは、スタチン使用者の約７％で起こる。筋肉痛は、軽度から重度までのいずれかであり得、筋活動によって悪化することが多い。例えば、高コレステロール血症および最近の心筋梗塞を有する患者において、症状が耐容可能であり、スタチン処置の効能が強い場合、継続したスタチン処置が、適切である場合がある。

【０２０５】

スタチン処置をガイドする機関によってスタチン処置を開始する前のベースラインクレアチンキナーゼ（ＣＫ）レベルは、一様には推奨されないが、ＣＫレベルは、筋肉症状を後に生じさせるか否かの非常に有用な情報をもたらすことができる。筋力低下も起こり得、これは、質において疲労性であり、痛み、およびＣＫの上昇と組み合わされることが多い。ほとんどのミオパチーと同様に、脱力が近位で最も顕著である。横紋筋融解症のまれなエピソードも、スタチン療法で起こっており、これらは、はるかに頻度が少ないが、場合により致命的となり得る。スタチンミオパチーで最も一般的である、筋肉の組織診断で見ることができる変化は、チトクロムオキシダーゼ陰性繊維、脂質含量の増大、および荒れた赤色繊維である。自己免疫性壊死性ミオパチーは、スタチンミオパチーの珍しい型である。これらの患者では、スタチン系の薬物を中止しても、薬物を絶って数カ月後でさえ、回復につながらない。患者は、主に近位の、多くの場合無痛性の脱力を有する。

【０２０６】

診断は、個体の病歴、身体検査および筋力の試験の結果、ならびに様々な筋肉酵素および自己抗体のレベルの上昇を示す血液試料に基づく。診断ツールとしては、収縮中および安静時に筋肉をコントロールする電気的活動を記録するための筋電図検査、筋肉炎症を探すための超音波、ならびに異常な筋肉を明らかにし、筋肉疾患を評価するための磁気共鳴画像法がある。筋生検は、慢性炎症、筋線維の死、血管奇形の徴候、またはＩＢＭの診断に特異的な変化について、顕微鏡観察によって検査することができる。皮膚生検は、皮膚筋炎を有する患者の皮膚層の変化を示すことができる。

【０２０７】

間質性肺疾患（ＩＬＤ）は、瘢痕（即ち、「線維症」）および／または肺の炎症によって特徴付けられる１３０超の障害を含む肺疾患の広いカテゴリーである。ＩＬＤは、呼吸器科医によって見られる症例の１５％を占める。間質性肺疾患（ＩＬＤ）は、他の疾患から環境要因に及ぶ様々な源から生じ得る。ＩＬＤの公知の原因のいくつかには、例えば、強皮症／進行性全身性硬化症、ループス（全身性エリテマトーデス）、関節リウマチ、および多発性筋炎／皮膚筋炎を含めた結合組織病または自己免疫疾患；粉塵、およびある特定のガス、毒物、化学療法、および放射線療法への曝露を含めた職業性の、および環境的な曝露が含まれる。

【０２０８】

ＩＬＤでは、肺内の組織は、炎症性かつ／または瘢痕化の状態になる。肺の間質は、酸素と二酸化炭素の交換が行われる小血管および肺胞（空気袋）の中および周囲の範囲を含む。間質の炎症および瘢痕は、この組織を破壊し、肺が空気から酸素を抽出する能力を減少させる。

【０２０９】

ＩＬＤの進行は、疾患によって、かつ人によって変化する。間質性肺疾患は、肺内の酸素および二酸化炭素の移動を混乱させるので、その症状は一般に、呼吸の問題として顕在化する。ＩＬＤの２つの最も一般的な症状は、運動での息切れ、および非生産的な咳である。

【０２１０】

アッシャー症候群は、聴覚および視覚の両方に影響する最も一般的な状態である。アッシャー症候群の主要な症状は、聴力低下および網膜色素変性症（ＲＰ）である。ＲＰは、網膜の進行性変性によって夜盲症および周辺視野（サイドビジョン）の喪失を引き起こす。ＲＰが進行するにつれて、中心視のみが残るまで視界が狭くなる。アッシャー症候群を有する多くの人は、重度のバランス問題も有する。聾であるすべての小児のおよそ３～６

パーセント、および難聴である小児の別の３～６パーセントが、アッシャー症候群を有する。米国などの先進国では、１００，０００の出生毎に約４人の赤ん坊がアッシャー症候群を有する。アッシャー症候群は、常染色体劣性形質として遺伝する。ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素を含めたいくつかの遺伝子座がアッシャー症候群と関連している（Puffenbergerら、（２０１２年）PLoS ONE、７巻（１号）、ｅ２８９３６頁、doi: 10.1371 / journal. pone.0028936）。

【０２１１】

アッシャー症候群の３つの臨床型、１型、２型、および３型がある。米国では、１型および２型が最も一般的な型である。合わせると、これらは、アッシャー症候群を有する小児のすべての症例のおよそ９０～９５パーセントを占める。

【０２１２】

１型アッシャー症候群を有する小児は、出生時に深刻に聾であり、重度のバランス問題を有する。１型アッシャー症候群に関連したバランス問題のために、この障害を有する小児は、支持体なしで座るのが遅く、一般に、彼らが生後１８か月になる前に独立して歩かない。これらの小児は通常、小児期早期に、ほとんど常に彼らが１０歳に到達する時までに、視覚問題が生じ始める。視覚問題は、ほとんどの場合、夜に見ることが困難であることから始まるが、その人が完全に盲目になるまで急速に進行する傾向がある。

【０２１３】

２型アッシャー症候群を有する小児は、中等度から重度の聴力低下および正常なバランスを伴って出生する。聴力低下の重症度は変動するが、これらの小児のほとんどは、補聴器から恩恵を得ることができ、口でやり取りすることができる。２型アッシャー症候群における視覚問題は、１型におけるものよりゆっくりと進行する傾向があり、ＲＰの発症は、１０代まで明らかでないことが多い。

【０２１４】

３型アッシャー症候群を有する小児は、出生時に正常な聴覚を有する。この障害を有するほとんどの小児は、正常からほぼ正常なバランスを有するが、一部は、後にバランス問題を生じさせ得る。聴覚および視覚は、経時的に悪化するが、これらが低下する速度は、同じファミリー内でさえ人によって変化し得る。３型アッシャー症候群を有する人は、１０代までに聴力低下を生じさせる場合があり、彼または彼女は、通常、中期成人期から後期成人期までに補聴器を必要とすることになる。夜盲症は通常、思春期の間のある時に始まる。盲点が十代後半から早期成人期までに現れ、中期成人期までに、その人は通常、法律的に盲目である。

【０２１５】

ペロー症候群（ＰＳ）は、感音難聴（sensorineural hearing impairment）、および一部の被験体では、進行性小脳失調症および知的障害を含めた神経学的異常を有する女性における卵巣発育不全の関連によって特徴付けられる。ペロー症候群の正確な有病率は未知であり、特に、性腺機能低下症が特徴でなく、この症候群が未検出のままである男性において、おそらく過少診断されている。診断時平均年齢は、感音難聴（sensorineural deafness）を有する女性の思春期の遅れを提示した後の２２歳である。聴覚欠陥は、報告された症例の１つを除くすべてにおいて認められた（８歳の診断時平均年齢）。聴力低下は、常に感音性で両側であるが、重症度は、同じファミリーからの影響された患者においてさえ、多様である（軽度から深刻）。卵巣発育不全は、すべての女性の症例において報告されたが、生殖腺欠損は、男性においてまったく検出されていない。無月経は、一般に原発性であるが、続発性無月経も報告されている。成長遅延（第３パーセンタイル未満の身長）は、記録に残された症例の半分において報告された。神経学的異常の正確な頻度は未知であるが、神経学的異常を欠く９人の女性および２人の男性（１６～３７歳）が報告されている。神経学的兆候は、進行性であり、一般に後年に現れるが、歩行遅延または早期の頻繁な転倒が、若いＰＳ患者において認められた。一般的な神経学的兆候は、失調症、統合運動障害、外眼運動の制限、および多発ニューロパチーである。脊柱側弯症を伴ったいくつかの症例も報告されている。ＰＳの伝播は常染色体劣性であり、ペロー症候群に

関連した卵巣発育不全および感音性聴力低下を引き起こすミトコンドリア（mitochrondrial）ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の変異が最近同定された。（Pierceら、（２０１１年）、PNAS USA.、１０８巻（１６号）６５４３～６５４８頁）。

【０２１６】

筋ジストロフィーは、強度および筋肉量が徐々に低下する遺伝性障害の群を指す。筋ジストロフィーのすべては、１種または複数種の筋肉特異的遺伝子中の原発性遺伝子欠陥によって推進される筋力低下によって特色付けられる。さらに、筋ジストロフィーは一般に、筋肉の炎症を推進し、最終的に筋組織の変性を増強する多様な炎症成分を有する。少なくとも９つの型の筋ジストロフィーが一般に認識されている。

【０２１７】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）：ＤＭＤは、若い男子に影響し、進行性筋力低下を引き起こし、通常脚から始まる。これは、筋ジストロフィーの最も重度の形態である。ＤＭＤは、３，５００人の男性の出生中約１人で起こり、米国においておよそ８，０００の男子および若い男性に影響する。より軽度の形態がごくわずかな女性キャリアにおいて起こる。

【０２１８】

ＤＭＤは、機能タンパク質の産生を妨げるジストロフィン関連糖タンパク質複合体（ＤＧＣ）内で機能する筋細胞膜下タンパク質であるジストロフィンをコードする遺伝子中の変異によって引き起こされる。ジストロフィンの量は、疾患の重症度と相関する（即ち、存在するジストロフィンが少ないほど、表現型がより重度である）。ＤＧＣ複合体は、細胞内細胞骨格を細胞外マトリックスに接続する。ＤＧＣは、サルコメアのＺ線で濃縮されており、筋繊維にわたって力の伝達を付与する。このリンクの破壊は、膜不安定性をもたらし、それは、最終的に筋細胞膜の破裂をもたらす。細胞外カルシウムが流入すると、筋収縮のような分子過程が変化し、タンパク質分解活性が活性化される。影響された筋繊維は、壊死性またはアポトーシス性となり、炎症過程を開始する分裂促進化学誘引物質を放出する。変性および再生のサイクルは、最終的に、線維性組織および脂肪組織による非可逆性の筋肉の消耗および置き換えをもたらす。

【０２１９】

デュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する男子は、通常、未就学児の際に症状を示し始める。脚が最初に影響され、歩行を困難にし、バランス問題を引き起こす。ほとんどの患者は、予期されるより３～６カ月後に歩き、走ることが困難である。拘縮（永続的な筋肉の引き締め）は通常、５歳または６歳までに、腓腹筋において最も激しく始まる。頻繁な転倒および骨折が、この年齢における一般的な始まりである。人の手を借りないで階段を上ること、および立ち上がることは、９歳または１０歳までに不可能となり得、ほとんどの男子は、１２歳までにモビリティーのために車椅子を使用する。この年齢付近で体幹筋肉が弱まると、脊柱側弯症（左右の脊柱の湾曲）および脊柱後弯症（前後の湾曲）をもたらすことが多い。

【０２２０】

ＤＭＤの最も重篤な脱力の１つは、呼吸および咳嗽の主要な仕事を実施する腹部頂部の筋肉のシートである横隔膜の脱力である。横隔膜の脱力は、エネルギーおよびスタミナを低減させ、有効に咳をすることができないために肺感染を増大させる。ＤＭＤを有する若い男性は、その２０代以上まで生きることができ、ただし、彼らは、機械的な換気支援および良好な呼吸器衛生を有する。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、ＤＭＤを有する被験体は、以下のうちの１種または複数によって特徴付けられる：陽性のガワーズ徴候（Gower's sign）、下肢の筋肉の反射障害；血液中の高レベルのクレアチンキナーゼ（ＣＰＫ－ＭＭ）；Ｘｐ２１遺伝子中の遺伝的エラー；または例えば、筋生検によって測定した場合のジストロフィンのレベルの低減もしくは非存在。

【０２２２】

ＨＲＳ組成物を、単独で、または他の療法、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、エテプリルセンなどのエクソンスキッピング療法）、コルチコステロイド、ベータ２－アゴニスト、理学療法、呼吸補助、幹細胞療法、および遺伝子置換療法などと組み合わせて、ＤＭＤの処置において使用することができる。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドを投与すると、６分間歩行テストにおいて統計的に有意な改善がもたらされる。

【０２２３】

ベッカー型筋ジストロフィー（ＢＭＤ）：ＢＭＤは、ＤＭＤより穏やかな過程に従って、成年男子および若い男性に影響する。ＢＭＤは、３０，０００人の男性の出生中約１人に起こる。ベッカー型筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのそれほどひどくないバリアントであり、トランケートされているが部分的に機能的な形態のジストロフィンの産生によって引き起こされる。

【０２２４】

ＢＭＤの症状は通常、小児期後期から早期成人期に現れる。症状の進行は、ＤＭＤのものと匹敵し得るが、症状は通常、より穏やかであり、過程はより多様である。脊柱側弯症が起こり得るが、通常、より穏やかであり、よりゆっくりと進行する。心筋疾患（心筋症）が、ＢＭＤにおいてより一般に起こる。問題として、不規則な心拍（不整脈）およびうっ血性心不全を挙げることができる。症状として、疲労、息切れ、胸痛、および眩暈を挙げることができる。呼吸器の脱力も起こり、機械的な換気の必要に至り得る。

【０２２５】

エメリードレイフス型筋ジストロフィー（ＥＤＭＤ）：ＥＤＭＤは、若い男子に影響し、ふくらはぎの拘縮および脱力、肩および上腕の脱力、ならびに電気インパルスが心臓を通って移動して心臓を鼓動させる仕方の問題（心臓伝導欠損）を引き起こす。エメリードレイフス型筋ジストロフィーの３つのサブタイプがあり、これらの遺伝のパターン、即ちＸ染色体連鎖性、常染色体優性、および常染色体劣性によって区別可能である。Ｘ染色体連鎖型が最も一般的である。各タイプは、有病率および症状が異なる。この疾患は、ＬＭＮＡ遺伝子、またはより一般に、ＥＭＤ遺伝子中の変異によって引き起こされる。両遺伝子は、核膜のタンパク質成分をコードする。

【０２２６】

ＥＤＭＤは通常、小児期早期に始まり、多くの場合、筋力低下の前に拘縮を伴う。脱力は、腓腹筋とともに肩および上腕に最初に影響し、下垂足をもたらす。ＥＤＭＤを有するほとんどの男性は、中年まで生存するが、心臓のリズムの欠陥（心ブロック）が、ペースメーカーで処置されない場合、致命的となり得る。

【０２２７】

肢帯型筋ジストロフィー（ＬＧＭＤ）：ＬＧＭＤは、小児期後期から早期成人期に始まり、男性および女性の両方に影響し、腰および肩の周囲の筋肉において脱力を引き起こす。これは、筋ジストロフィーのうちでもっとも多様であり、いくつかの異なる形態の疾患が現在認識されている。ＬＧＭＤが疑われる多くの人は、過去においておそらく誤診されてきており、したがって、疾患の有病率は、推定することが困難である。米国において影響された人の数は、２～３千人（low　thousands）であり得る。

【０２２８】

様々なタイプのＬＧＭＤを引き起こす少なくとも６種の遺伝子が存在するが、ＬＧＭＤの２つの主要な臨床型が通常認識される。重度の小児期の形態は、外見においてＤＭＤと同様であるが、常染色体劣性形質として遺伝される。

【０２２９】

肢帯型筋ジストロフィー２Ｂ型（ＬＧＭＤ２Ｂ）は、ジスフェリン遺伝子中の機能喪失型変異によって引き起こされる。ジスフェリンは、骨格筋および心筋において主に発現されるが、単球、マクロファージ、ならびにこれが細胞質小胞および細胞膜に局在化している他の組織においても発現される。ジスフェリンは、膜融合および輸送、ならびに修復過程に関与していると思われる。ＬＧＭＤ２Ｂは、進行性の対称的な筋力低下、および特に

、攻撃的な免疫性／炎症性病理によって特徴付けられる後期発症（１０代／若い成人）筋肉疾患である。筋肉生検は一般に、筋繊維変性／再生と一緒に、マクロファージ／マクロファージ活性化マーカー（ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＡＢＣ、ＣＤ８６）、ＣＤ８$^{+}$細胞毒性Ｔ細胞、およびＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞から主になる顕著な炎症細胞浸潤を示す。

【０２３０】

成人発症のＬＧＭＤの症状は通常、人の１０代または２０代において現れ、胴体に最も近い筋肉の進行性脱力および消耗によって特色付けられる。拘縮が起こり得、歩行する能力は通常、発症して約２０年後に失われる。ＬＧＭＤを有する一部の人は、人工呼吸器の使用を必要とする呼吸器の脱力を生じさせる。寿命は、いくぶん短くなり得る。（常染色体優性型は通常、後年に起こり、相対的にゆっくりと進行する）。

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（ＦＳＨ）：ＦＳＨは、Ｌａｎｄｏｕｚｙ－Ｄｅｊｅｒｉｎｅ病としても公知であり、小児期後期から早期成人期に始まり、男性および女性の両方に影響し、顔、肩、および上腕の筋肉の脱力を引き起こす。腰および脚も影響され得る。ＦＳＨは、２０，０００人毎に約１人に起こり、米国においておよそ１３，０００人に影響する。

【０２３１】

ＦＳＨは、同じファミリーのメンバーの中でさえ、その重症度および発症の年齢が多様である。症状は、ほとんど一般に、１０代または早期２０代に始まるが、乳児または小児期の発症もあり得る。症状は、より早く発症したものにおいてより重度である傾向がある。この疾患は、疾患によって最も激しく影響される体の領域、即ち、顔（ｆａｃｉｏ－）、肩（ｓｃａｐｕｌｏ－）、および上腕（ｈｕｍｅｒａｌ）の筋肉にちなんで命名されている。腰および脚も同様に影響され得る。ＦＳＨを有する小児は、部分的または完全な聾を生じさせることが多い。

【０２３２】

２つの欠陥がＦＳＨＤに必要であり、第１は、Ｄ４Ｚ４リピートの欠失であり、第２は、ＤＵＸ４遺伝子の「機能の毒性ゲイン」である。気付かれる最初の症状は、多くの場合、肩より上に物体を持ち上げることの困難である。脱力は、一方の側で、他方より大きい場合がある。肩の脱力はまた、肩甲骨を後方に張り出させ、肩甲骨のウィンギングと呼ばれる。

【０２３３】

筋緊張性ジストロフィー：筋緊張性ジストロフィーは、シュタイネルト病としても公知であり、男性および女性の両方に影響し、顔、足、および手に最初に見られる全般的な脱力を引き起こす。これは、影響された筋肉をほぐすことができないこと（ミオトニー）を伴う。症状は、出生から成人期まで始まり得る。筋緊張性筋ジストロフィー１型（ＤＭ１）は、米国において３０，０００超の人に影響している筋ジストロフィーの最も一般的な形態である。これは、ＤＭＰＫ（筋緊張性ジストロフィープロテインキナーゼ）遺伝子のＤＮＡ配列中の短い（ＣＴＧ）リピートの拡張から生じる。筋緊張性筋ジストロフィー２型（ＤＭ２）は、はるかにまれであり、ＺＮＦ９（亜鉛フィンガータンパク質９）遺伝子中のＣＣＴＧリピートの拡張の結果である。

【０２３４】

筋緊張性ジストロフィーの症状としては、顔の脱力、およびたるみ顎、眼瞼下垂（下垂症）、ならびに前腕およびふくらはぎにおける筋肉の消耗がある。このジストロフィーを有する人は、特に物体が冷たい場合に、自分の把持を緩めることが困難である。筋緊張性ジストロフィーは、心筋に影響し、不整脈および心ブロックを引き起こし、消化器系の筋肉に影響し、運動障害および便秘をもたらす。他のボディシステムも同様に影響され、筋緊張性ジストロフィーは、白内障、網膜変性症、低ＩＱ、前頭部脱毛、皮膚障害、精巣萎縮、睡眠時無呼吸、およびインスリン抵抗性を引き起こし得る。睡眠の必要性または願望の増大は、減少動機と同様に一般的である。重度の身体障害が発症の２０年以内にこのタイプのジストロフィーを有するほとんどの人に影響するが、ほとんどは、生涯の後期でさえ車椅子を必要としない。ＨＲＳ組成物を使用して、例えば、他の組織の中でも骨格筋（

例えば、四頭筋）および／または心臓組織を含めた筋組織に関連した炎症を低減することによって、筋緊張性ジストロフィーを処置することができる。

【０２３５】

眼咽頭型筋ジストロフィー（ＯＰＭＤ）：ＯＰＭＤは、男女の成人に影響し、眼筋およびのどの脱力を引き起こす。これは、ケベックにおけるフランス系カナダ人ファミリー、および米国南西部におけるスペイン系アメリカ人ファミリーにおいて最も一般的である。

【０２３６】

ＯＰＭＤは通常、眼およびのどをコントロールする筋肉の脱力を伴って、人の３０代または４０代において始まる。症状には、眼瞼下垂、嚥下困難（嚥下障害）が含まれ、脱力は、顔、首、および場合によっては上肢の他の筋肉まで進行する。嚥下運動困難は、気道内への食物または唾液の誤嚥または導入を引き起こす場合がある。肺炎が続き得る。

【０２３７】

遠位型筋ジストロフィー（ＤＤ）：ＤＤは、中年または後期に始まり、足および手の筋肉の脱力を引き起こす。これは、スウェーデンで最も一般的であり、世界の他の部分ではまれである。ＤＤは通常、手、前腕、および下腿の脱力を伴って、２０代または３０代に始まる。タイピングまたはボタンを締めることなどの細かい運動に対する困難が、最初の症状であり得る。症状は、ゆっくりと進行し、この疾患は通常、寿命に影響しない。

【０２３８】

先天型筋ジストロフィー（ＣＭＤ）：ＣＭＤは、出生から存在し、全般的な脱力をもたらし、通常、徐々に進行する。Ｆｕｋｕｙａｍａ　ＣＭＤと呼ばれるサブタイプは、精神遅滞も伴う。両方は、まれであり、Ｆｕｋｕｙａｍａ　ＣＭＤは、日本でより一般的である。

【０２３９】

ＣＭＤは、出生からの重度の筋力低下によって特色付けられ、乳児は、「フロッピネス（floppiness）」および非常に少ない随意運動を示す。それにもかかわらず、ＣＭＤを有する小児は、何らかの補助器具の有無にかかわらず、歩行することを学ぶことができ、青年期またはそれ以上まで生きる。対照的に、Ｆｕｋｕｙａｍａ　ＣＭＤを有する小児は、歩行することがほとんどできず、重度の精神遅滞を有する。このタイプのＣＭＤを有するほとんどの小児は、小児期に死ぬ。

【０２４０】

悪液質：悪液質（または消耗症候群）は一般に、体重を能動的に減少させようとしていない人における体重減少、筋萎縮、疲労、脱力、および著しい食欲低下によって特徴付けられる。悪液質の公式の定義は、栄養的に逆戻りさせることができない体質量の減少である。影響された患者がより多くのカロリーを消費しても、除脂肪体重が失われ、原発病理の存在を示唆する。

【０２４１】

悪液質は、他の疾患の中でも、がん、ＡＩＤＳ、慢性閉塞性肺疾患、多発性硬化症、うっ血性心不全、結核、家族性アミロイド多発ニューロパチー、水銀中毒（先端疼痛症）、およびホルモン欠乏症を有する患者が経験する。

【０２４２】

悪液質はまた、がん、代謝性アシドーシス（即ち、タンパク質合成の減少およびタンパク異化の増大）、ある特定の感染症（例えば、結核、ＡＩＤＳ）、慢性膵炎、自己免疫障害、またはアンフェタミン中毒を含めた様々な基本的な障害の徴候であり得る。悪液質は、食欲低下、無力症、および貧血に起因して不動の状態まで患者を身体的に衰弱させ、標準的な処置に対する応答は、通常芳しくない。

【０２４３】

すべてのがん患者の約５０％が悪液質を罹患する。上部消化管がんおよび膵がんを有するものは、悪液質症状を生じさせる頻度が最高である。罹患率および死亡率の増大、化学療法の副作用の憎悪、ならびに生活の質の低減に加えて、悪液質は、患者の２２％～４０％の範囲である、がん患者の大きな比率の死の直接原因と考えられている。がん悪液質の

症状としては、進行性の体重減少、および脂肪組織および骨格筋のホストリザーブ（host reserve）の枯渇がある。伝統的な処置手法としては、食欲刺激薬、５－ＨＴ$_3$アンタゴニスト、栄養補給、およびＣＯＸ－２阻害剤の使用がある。

【０２４４】

悪液質の病原はよく理解されていないが、ＴＮＦ－αなどの炎症促進性サイトカイン、神経内分泌ホルモン、ＩＧＦ－１、およびタンパク質分解誘導因子などの腫瘍特異的因子を含めた、複数の生物学的経路が関与していると予期されている。

【０２４５】

したがって、ＨＲＳ組成物を使用して、悪液質、およびその関連した、基本的な、または続発性の障害または合併症のいずれかを処置することができる。ＨＲＳ組成物は、単独で、または他の療法、例えば、とりわけ、高タンパク質、ロイシン、および魚油の組合せを用いた食事補給、抗酸化剤、プロゲストゲン（酢酸メゲストロール、酢酸メドロキシプロゲステロン）、ならびに抗シクロオキシゲナーゼ－２薬、食欲刺激薬、ならびに５－ＨＴ$_3$アンタゴニストなどと組み合わせて使用することができる。

【０２４６】

横紋筋融解症：横紋筋融解症は、骨格筋組織中の筋繊維の分解である。分解生成物が血流中に放出され、ミオグロビンなどのこれらの生成物のある特定のいくつかは、腎臓に有害であり、腎不全をもたらし得る。

【０２４７】

症状としては、筋痛、嘔吐、錯乱、昏睡、または異常な心拍数およびリズムがあり、これらの重症度は通常、筋損傷の程度、および腎不全を生じさせるか否かに依存する。腎臓への損傷は、初期の筋損傷の通常約１２～２４時間後に、尿産生の減少または非存在を引き起こし得る。損傷した筋肉が腫脹すると、同じ筋膜コンパートメント内でのコンパートメント症候群、または神経および血管などの周囲組織の圧縮が起こり得、失血、および影響された身体部分の損傷（例えば、機能の喪失）に至り得る。この合併症の症状は、影響された肢内の痛みまたは感覚の低減を含む。他の合併症としては、播種性血管内凝固症候群（ＤＩＣ）、コントロールできない出血に至り得る血液凝固の重度の破壊がある。

【０２４８】

初期の筋損傷は、例えば、身体的要因（例えば、挫滅外傷、激しい運動）、血液供給の変化（例えば、動脈血栓症、塞栓症）、代謝の変化（例えば、高血糖高浸透圧状態、高ナトリウム血症および低ナトリウム血症、低カリウム血症、低カルシウム血症、低リン血症、ケトアシドーシス、甲状腺機能低下症）、体温の変化（高体温、低体温）、医薬品および毒素（例えば、スタチン、抗精神病医薬品、神経筋遮断剤、利尿薬、重金属、アメリカツガ、昆虫、またはヘビの毒液）、薬物乱用（例えば、アルコール、アンフェタミン、コカイン、ヘロイン、ケタミン、ＬＤＳ、ＭＤＭＡ）、感染（例えば、コクサッキーウイルス、インフルエンザＡウイルス、インフルエンザＢウイルス、エプスタイン－バーウイルス、一次ＨＩＶ感染、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ、ヘルペスウイルス、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ、サルモネラ）、ならびに自己免疫性筋損傷（例えば、多発性筋炎、皮膚筋炎）によって引き起こされ得る。解糖欠陥およびグリコーゲン分解の欠陥（例えば、マッカードル病、ホスホフルクトキナーゼ欠損、糖原病ＶＩＩＩ、ＩＸ、Ｘ、およびＸＩ）、脂質代謝不良（例えば、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼＩおよびＩＩ欠損、アシルＣｏＡデヒドロゲナーゼのサブタイプの欠損（例えば、ＬＣＡＤ、ＳＣＡＤ、ＭＣＡＤ、ＶＬＣＡＤ、３－ヒドロキシアシル－補酵素Ａデヒドロゲナーゼ欠損）、チオラーゼ欠損）、ミトコンドリアミオパチー（例えば、コハク酸脱水素酵素、チトクロムｃオキシダーゼ、および補酵素Ｑ１０の欠損）、ならびにその他、例えば、グルコース－６－リン酸脱水素酵素欠損、ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損、および筋ジストロフィーなどを含めたある特定の遺伝性状態も、横紋筋融解症のリスクを増大させる。

【０２４９】

横紋筋融解症は通常、血液検査および尿検査で診断され、上昇した、もしくは増加中の

クレアチニンおよび尿素レベル、低下中の尿排出量、または尿の赤茶色変色によって指摘することができる。一次処置としては、静脈内輸液、透析、および血液濾過がある。

【０２５０】

したがって、ＨＲＳ組成物を使用して、横紋筋融解症、およびその関連した、続発性の、または基本的な障害または合併症のいずれかを処置することができる。ＨＲＳ組成物は、単独で、またはショックを処置し、腎機能を保存することを意図したものを含めた他の療法と組み合わせて使用することができる。例示的な療法としては、静脈内輸液、通常、等張食塩水（塩化ナトリウム溶液の体積当たり０．９重量％）の投与、ならびに腎代替療法（ＲＲＴ）、例えば、血液透析、連続血液濾過、および腹膜透析などがある。

【０２５１】

より一般に、本明細書に記載のＨＲＳポリペプチドは、諸機構の中でも、免疫細胞の選択された組織中への遊走もしくは浸潤を低減し、抗炎症性サイトカインの産生を増大させ、または炎症促進性サイトカインの産生もしくは活性を低減することなどによって、炎症反応を低減することができる。

【０２５２】

したがって、本発明のＨＲＳポリペプチドは、急性炎症、慢性炎症、または両方を調節するのに使用することができる。ある特定の実施形態は、急性炎症または急性炎症反応を増大させることに関し、ある特定の実施形態は、慢性炎症または慢性炎症反応を増大させることに関する。被験体の要求に応じて、ある特定の実施形態は、急性炎症または炎症反応を低減することに関し、ある特定の実施形態は、慢性炎症または慢性炎症反応を低減することに関する。

【０２５３】

急性炎症は、おそらく有害な刺激に対する体の初期応答に関し、血液から傷害組織中への血漿および白血球の移動を増大させる。これは一般に、数分または数時間以内に始まり、傷害性の刺激を除去した際に終わる短期間プロセスである。急性炎症は、発赤、熱の上昇、腫張、痛み、および機能の喪失の任意の１つまたは複数によって特徴付けることができる。発赤および熱は主に、炎症部位への中核体温の血流の増大に起因し、腫張は、体液の蓄積によって引き起こされ、痛みは一般に、神経終末を刺激する化学物質の放出に起因し、機能の喪失は、複数の原因を有する。

【０２５４】

急性炎症反応は、局所免疫細胞、例えば、常駐マクロファージ、樹状細胞、リンパ球、クッパー細胞（Kuppfer cell）、およびＴ細胞などによって主に開始される。感染、火傷、または他の傷害の発生時に、これらの細胞は、活性化を受け、炎症の臨床徴候を担う炎症性メディエーター、例えば、血管作用性アミンおよびエイコサノイドなどを放出する。血管拡張およびその結果として生じる血流の増大が、発赤および熱の上昇を引き起こす。血管の浸透性が増大すると、組織中への血漿タンパク質および体液の滲出または漏れが生じ、それが腫張を作り出す。ブラジキニンなどのある特定の放出されるメディエーターは、痛みに対する感度を増大させ、好中球などの白血球の遊走または細胞外遊走を可能にするように血管を変化させ、これらの白血球は一般に、局所免疫細胞によって作られる走化性勾配に沿って遊走する。

【０２５５】

急性炎症反応には、炎症反応を開始し、伝播させるように並行して作用する予め形成された血漿タンパク質モジュレート（plasma proteins modulate）からなる１種または複数種の無細胞生化学的カスケードシステムも含まれる。これらのシステムとしては、細菌によって主に活性化される補体系、ならびにある特定の感染、火傷、または他の外傷によって引き起こされる組織損傷のタイプなどのネクローシスによって主に活性化される凝固系および線溶系がある。したがって、ＨＲＳポリペプチドを使用して、急性炎症、または個々の急性炎症反応の１種もしくは複数のいずれかを調節することができる。

【０２５６】

慢性炎症は、長引く、遅れた炎症反応であり、炎症部位に存在する細胞のタイプの進行

性のシフトによって特徴付けられ、炎症過程からの組織の同時またはほぼ同時の破壊およびヒーリングをもたらすことが多い。細胞レベルで、慢性炎症反応は、様々な免疫細胞、例えば、単球、マクロファージ、リンパ球、血漿細胞、および線維芽細胞などを伴うが、顆粒球によって主に媒介される急性炎症とは対照的に、慢性炎症は、単球およびリンパ球などの単核細胞によって主に媒介される。慢性炎症は、ＩＦＮ－γおよび他のサイトカインなどの様々な炎症性メディエーター、増殖因子、活性酸素種、ならびに加水分解酵素も伴う。慢性炎症は、数カ月または数年にわたって続く場合があり、望まれない組織破壊および線維症をもたらし得る。

【０２５７】

慢性炎症の臨床徴候は、疾病の持続時間、炎症性病変、原因、および影響された解剖学的領域に依存する（例えば、Kumarら、Robbins Basic Pathology－８版、２００９年、Elsevier、London；Miller, LM、Pathology Lecture Notes、Atlantic Veterinary College、Charlottetown、PEI、カナダを参照）。慢性炎症は、本明細書に記載および当技術分野で公知のものの中でも、例えば、アレルギー、アルツハイマー病、貧血、大動脈弁狭窄、関節炎、例えば、関節リウマチおよび骨関節炎など、がん、うっ血性心不全、線維筋痛症、線維症、心発作、腎不全、ループス、膵炎、脳卒中、外科合併症、炎症性肺疾患、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化症、ならびに乾癬を含めた、様々な病理学的状態または疾患に関連する。したがって、ＨＲＳポリペプチドを使用して、慢性炎症を処置もしくは管理し、個々の慢性炎症反応の１種もしくは複数のいずれかを調節し、または慢性炎症に関連した任意の１種もしくは複数種の疾患もしくは状態を処置することができる。

【０２５８】

ＨＲＳポリペプチドは、組織細胞の数の増加によって特徴付けられる炎症過程である増殖性炎症も調節することができる。これらは、皮膚状態、例えば、乾癬、脂漏症、もしくは湿疹などを包含することができ、または特に、軽度の慢性炎症でさえ記録に残すためのより効率的な分子法に基づく累積証拠を踏まえると、がんおよび異常増殖の観点から考えることもできる。

【０２５９】

ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、炎症に関与する様々な細胞の活性化、炎症分子分泌（例えば、サイトカインもしくはキニン分泌）、増殖、活性、遊走、または接着を調節することなどによって、細胞レベルで炎症反応を調節することができる。このような細胞の例としては、免疫細胞および血管細胞がある。免疫細胞としては、例えば、顆粒球、例えば、好中球、好酸球、および好塩基球など、マクロファージ／単球、リンパ球、例えば、Ｂ細胞、キラーＴ細胞（即ち、ＣＤ８＋Ｔ細胞）、ヘルパーＴ細胞（即ち、Ｔ１およびＴ２細胞を含めたＣＤ４＋Ｔ細胞）、ナチュラルキラー細胞、γδＴ細胞、樹状細胞、および肥満細胞などがある。血管細胞の例としては、平滑筋細胞、内皮細胞、および線維芽細胞がある。好中球－媒介性、マクロファージ－媒介性、およびリンパ球－媒介性炎症状態を含めた、１種または複数種の免疫細胞または血管細胞に関連した炎症状態を調節する方法も含まれる。

【０２６０】

ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、局所炎症、全身性炎症、または両方を調節する。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、局所炎症または局所炎症反応を低減または維持（即ち、さらなる増大を防止）することができる。ある特定の実施形態では、被験体の要求に応じて、ＨＲＳポリペプチドは、局所炎症または局所炎症反応を増大させることができる。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、全身性炎症または全身性炎症反応を低減または維持（即ち、さらなる増大を防止）することができる。ある特定の実施形態では、被験体の要求に応じて、ＨＲＳポリペプチドは、全身性炎症または全身性炎症反応を増大させることができる。

【０２６１】

ある特定の実施形態では、炎症または炎症反応の調節は、１種または複数種の組織また

は臓器に関連付けることができる。このような組織または臓器の非限定例としては、皮膚（例えば、真皮、表皮、皮下層）、毛嚢、神経系（例えば、脳、脊髄、末梢神経）、聴覚系または平衡器官（例えば、内耳、中耳、外耳）、呼吸器系（例えば、鼻部、気管、肺）、胃食道組織（gastroesophogeal tissue）、胃腸系（例えば、口、食道、胃、小腸、大腸、直腸）、血管系（例えば、心臓、血管、および動脈）、肝臓、胆嚢、リンパ系／免疫系（例えば、リンパ節、リンパ濾胞、脾臓、胸腺、骨髄）、泌尿生殖器系（例えば、腎臓、尿管、膀胱、尿道、子宮頸、ファロピウス管、卵巣、子宮、外陰部、前立腺、尿道球腺、精巣上体（epidiymis）、前立腺、精嚢、精巣）、筋骨格系（例えば、骨格筋、平滑筋、骨、軟骨、腱、靭帯）、脂肪組織、乳房、および内分泌系（例えば、視床下部、下垂体、甲状腺、膵臓、副腎）がある。したがって、ＨＲＳポリペプチドを使用して、これらの組織または臓器に関連した状態または疾患を処置するなど、これらの組織または臓器のいずれかに関連した炎症を調節することができる。

【０２６２】

上述したように、ある特定の実施形態は、特定の組織または臓器に関連した炎症または炎症反応を低減または管理（即ち、さらなる増大を防止）するのにＨＲＳポリペプチドを使用することができる。皮膚の真皮層、表皮層、および皮下層に関連した炎症、感染、およびがんを含めた皮膚に関連した炎症反応および状態が含まれる。皮膚関連炎症状態の例としては、限定することなく、皮膚炎、例えば、乾癬、刺激性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、アトピー性皮膚炎（湿疹）、アレルギー性接触皮膚炎、熱誘導性皮膚炎、薬物誘導性皮膚炎、汗疱状皮膚炎、じん麻疹、自己免疫性皮膚炎、黒色腫などの皮膚がん、および水疱性皮膚炎などがある。細菌感染、ウイルス感染、および寄生虫感染、多形性紅斑、結節性紅斑、環状肉芽腫、ウルシ／ツタウルシ、ならびに中毒性表皮剥離症も含まれる。

【０２６３】

ある特定の実施形態は、中枢神経系の脳および脊髄、末梢神経系、ならびに髄膜に関連した炎症、感染、ならびにがんを含めた神経系と関連した炎症反応ならびに状態を低減することに関する。補体、接着分子、シクロオキシゲナーゼ酵素、ならびにこれらの生成物およびサイトカインを含めた炎症性メディエーターの発現は、実験的ならびに臨床的な神経変性疾患において増大し、実験動物における介入研究により、これらの要因のいくつかは、ニューロン傷害に直接寄与することが示唆されている。例えば、インターロイキン－１（ＩＬ－１）などの特定のサイトカインは、急性神経変性、例えば、脳卒中および頭部外傷などにおいて重く関与している。

【０２６４】

神経系関連炎症状態の例としては、限定することなく、髄膜炎（即ち、脳および脊髄を覆う保護膜の炎症）、脊髄炎、脳脊髄炎（encaphaloymyelitis）（例えば、筋痛性脳脊髄炎、急性播種性脳脊髄炎（acute disseminated encephalomyelitis）、播種性脳脊髄炎（encephalomyelitis disseminata）、または多発性硬化症、自己免疫性脳脊髄炎）、クモ膜炎（即ち、中枢神経系の神経を囲繞および保護する膜の１つであるクモ膜の炎症）、肉芽腫、薬物誘導炎症または髄膜炎、アルツハイマー病などの神経変性疾患、脳卒中、ＨＩＶ－認知症、スライ症候群、ＣＭＴ、網膜症、感音性聴力低下（sensoriuenural hearing loss）、脊髄性筋萎縮症、ＡＬＳ、脳炎、例えば、ウイルス性脳炎および細菌性脳炎など、寄生虫感染、炎症性脱髄性障害、ならびにＣＮＳのＣＤ８＋Ｔ細胞媒介性自己免疫疾患などの自己免疫障害がある。追加の例としては、パーキンソン病、重症筋無力症、運動ニューロパチー、ギランバレー症候群、自己免疫性ニューロパチー、Ｌａｍｂｅｒｔ－Ｅａｔｏｎ筋無力症症候群、腫瘍随伴性神経疾患、腫瘍随伴性小脳萎縮、非腫瘍随伴性スティッフマン症候群、進行性小脳萎縮、ラスムッセン脳炎、筋萎縮性側索硬化症、シデナム舞踏病（Sydeham chorea）、ジルドラトゥレット症候群、自己免疫性多腺性内分泌障害、ディスイミューンニューロパチー（dysimmune neuropathy）、後天性神経性筋強直症、多発性関節拘縮症、視神経炎、およびスティッフマン症候群がある。

【０２６５】

上述したように、神経系の感染に関連した炎症も含まれる。神経系の炎症に関連した細

菌感染の具体例としては、限定することなく、連鎖球菌感染、例えば、Ｂ群連鎖球菌（例えば、サブタイプＩＩＩ）およびＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ（例えば、血清型６、９、１４、１８、および２３）など、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ（例えば、Ｋｌ抗原を担持する）、Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ（例えば、血清型ＩＶｂ）や、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ（髄膜炎菌）などのナイセリア感染、ブドウ球菌感染、ヘモフィルス（heamophilus）感染、例えば、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ Ｂ型、クレブシエラ、およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓなどがある。主に鼻腔内の細菌に髄膜スペースに入る潜在性を与える頭蓋の外傷に関して、または脳シャントもしくは関連デバイス（例えば、脳室外ドレイン（drain）、オンマヤリザーバー）を有する人におけるブドウ球菌およびシュードモナス、ならびに他のグラム陰性桿菌による感染も含まれる。神経系の炎症に関連したウイルス感染の具体例としては、限定することなく、エンテロウイルス、単純ヘルペスウイルス１型および２型、ヒトＴ－リンパ向性ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（水痘および帯状疱疹）、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ならびにリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）がある。髄膜炎は、スピロヘータ、例えば、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ（梅毒）およびＢｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ（ライム病）など、マラリア（例えば、脳性マラリア）などの寄生虫、Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓなどの真菌、ならびにＮａｅｇｌｅｒｉａ ｆｏｗｌｅｒｉなどのアメーバによる感染からも生じ得る。

【０２６６】

髄膜炎または他の形態の神経系の炎症は、髄膜へのがんの転移（悪性髄膜炎）、ある特定の薬物、例えば、非ステロイド性抗炎症薬、抗生物質、および静注用免疫グロブリンなど、サルコイドーシス（または神経サルコイドーシス）、全身性エリテマトーデスなどの結合組織障害、ならびにＢｅｌｉｅｆｓ病（Beliefs disease）などのある特定の形態の血管炎（血管壁の炎症状態）にも関連付けられる。類表皮嚢胞および皮様嚢腫は、クモ膜下空間内に刺激性物質を放出することによって髄膜炎を引き起こし得る。したがって、ＨＲＳポリペプチドは、これらの状態の任意の１種または複数を処置または管理することができる。

【０２６７】

ある特定の実施形態は、聴覚系または平衡器官、例えば、内耳、中耳、および外耳などに関連した炎症反応および状態を低減することに関する。聴覚系または平衡器官関連炎症状態の例としては、限定することなく、外耳炎（例えば、耳感染症）、通常空気で満たされた空間内の体液蓄積および関連した伝音難聴をもたらし得る中耳炎、眩暈（めまい）および聴力低下の両方を引き起こす内耳の感染または炎症である迷路炎、一般にウイルス性の、めまいを引き起こす前庭神経の感染である前庭ニューロン炎、ならびに一般にウイルス性の、急激な聴覚障害を引き起こすが、めまいをまったく引き起こさない蝸牛神経の感染である蝸牛のニューロン炎がある。聴力低下のための蝸牛インプラントのレシピエントは、肺炎球菌髄膜炎およびその関連炎症のリスクが増大している。

【０２６８】

ある特定の実施形態は、鼻部、気管、および肺に関連した炎症、感染、およびがんを含めた、呼吸器系に関連した炎症反応および状態を低減することに関する。呼吸器系関連炎症状態の例としては、限定することなく、炎症性肺疾患、アトピー性喘息、非アトピー性喘息、アレルギー性喘息、アトピー性気管支ＩｇＥ媒介喘息、気管支喘息、本態性喘息、真の喘息、病態生理学的妨害によって引き起こされる内因性喘息、環境要因によって引き起こされる外因性喘息、未知または不顕性の原因の本態性喘息、非アトピー性喘息、気管支炎喘息、気腫性喘息、運動誘導性喘息、アレルゲン誘導性喘息、冷気誘導性喘息、職業性喘息、細菌、真菌、原生動物、またはウイルスの感染によって引き起こされる感染性喘息、非アレルギー性喘息、初期喘息、喘鳴幼児症候群、および細気管支炎（bronchiolytis）、慢性または急性気管支収縮、慢性気管支炎、小気道閉塞、および気腫がある。さらなる例としては、閉塞性または炎症性気道疾患、例えば、慢性好酸球性肺炎、慢性閉塞性

肺疾患（ＣＯＰＤ）、ＣＯＰＤに関連した、または関連しない慢性気管支炎、肺気腫、または呼吸困難を含むＣＯＰＤ、非可逆性、進行性気道閉塞によって特徴付けられるＣＯＰＤ、および成人呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）などがある。

【０２６９】

肺炎症に関連した状態のさらなる例としては、他の薬物療法の結果として起こる気道過敏性の憎悪に関係した状態、肺高血圧症に関連した気道疾患、気管支炎、例えば、急性気管支炎、急性喉頭気管気管支炎、アラキジン気管支炎（arachidic bronchitis）、カタル性気管支炎、クループ性（croupus）気管支炎、乾性気管支炎、感染性喘息性気管支炎、生産的気管支炎（productive bronchitis）、ブドウ球菌または連鎖球菌気管支炎、および小胞性気管支炎など、急性肺傷害、ならびに気管支拡張症、例えば、円柱状気管支拡張症、小嚢性気管支拡張症（sacculated bronchiectasis）、紡錘状気管支拡張症、毛管状気管支拡張症（capillary bronchiectasis）、嚢胞性気管支拡張症、乾性気管支拡張症、および濾胞性気管支拡張症などがある。

【０２７０】

ＣＯＰＤは特に、気流を遮断し、影響された個体が正常に呼吸するのをますます困難にする肺疾患の群を指す。気腫および慢性気管支炎は、ＣＯＰＤ疾患の群の中の２つの主な状態であるが、ＣＯＰＤは、当技術分野で公知の状態の中でも、慢性喘息性気管支炎によって引き起こされる損傷も指す場合がある。ほとんどの場合、気道が損傷すると、最終的に、肺内での酸素と二酸化炭素の交換が妨害される。標準的な処置は、症状をコントロールし、さらなる損傷を最小限にすることに主に集中する。

【０２７１】

気腫は、ＣＯＰＤの一態様を代表する。気腫は、肺胞の脆弱な壁の中に炎症をもたらし、それは、壁および弾性繊維の一部を破壊し得、息を吐く際に小気道を崩壊させ、肺からの気流に障害を生じさせる。気腫の徴候および症状としては、例えば、特に身体活動中の息切れや、喘鳴、および胸苦しさがある。

【０２７２】

慢性気管支炎は、ＣＯＰＤの別の態様を代表する。慢性気管支炎は、進行中の咳によって特徴付けられ、気管支の炎症および狭小化をもたらす。この状態はまた、粘液産生を増大させ、それにより、狭くなった管がさらに遮断され得る。慢性気管支炎は、喫煙者において主に起こり、一般に、２年連続にわたって、１年に少なくとも３カ月続く咳として定義される。慢性気管支炎の徴候および症状としては、例えば、特に喫煙者について、朝一番にのどをクリアにしなければならないことや、黄色がかった痰を生じさせる慢性の咳、後の段階における息切れ、および頻繁な呼吸器感染症がある。上述したように、ＣＯＰＤは、２つの上述した慢性の肺状態から生じる肺内の閉塞を主に指す。しかし、ＣＯＰＤを有する多くの個体は、これらの状態の両方を有する。

【０２７３】

慢性喘息性気管支炎は、通常、喘息（気管支けいれん）と組み合わさった慢性気管支炎として特徴付けられるＣＯＰＤの別の態様を代表する。喘息は、炎症性分泌物および感染した分泌物が気道内の平滑筋を刺激するとき起こり得る。症状は、慢性気管支炎のものと同様であるが、断続的な、またはさらには毎日の、喘鳴のエピソードも含む。

【０２７４】

ある特定の実施形態では、ＣＯＰＤは、自己免疫成分も有し得る。例えば、重度の気腫を有する患者中の肺Ｔ細胞および末梢血Ｔ細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏで、エラスチンペプチドでスティミュレートされたとき、Ｔｈｌサイトカインおよびケモカインを分泌し、これらの患者は、対照と比較して、抗エラスチン抗体が増大している（Goswamiら、The Journal of Immunology.、１７８巻：１３０～４１頁、２００７年を参照）。また、肺上皮に対する結合活性を有するＩｇＧ自己抗体、および細胞傷害性を媒介する潜在性が、ＣＯＰＤを有する患者において蔓延している（Feghali-Bostwickら、Am Ｊ Respir Crit Care Med.、１７７巻：１５６～６３頁、２００８年）。例えば、エラスチンなどの自己抗原に対する自己反応性応答を含めた自己反応性免疫応答は、この疾患の病因において

重要であり得、ＣＯＰＤにおいて役割を果たし得るので、これらの抗原に対する免疫細胞を脱感作するためにＡＡＲＳポリペプチドを使用すると、肺炎症を低減することができる。

【０２７５】

上述したように、ある特定の実施形態は、肺炎症に関係した、自己抗原および外来抗原を含めた選択された抗原、刺激物、アレルゲン、または感染エージェントに対する免疫細胞を脱感作するためのＨＲＳポリペプチドの使用に関する。選択された抗原に対するこれらの免疫細胞を脱感作することによって、ＨＲＳポリペプチドは、肺へのこれらの細胞の遊走または動員を低減し、それによって炎症を低減することができる。免疫細胞の例としては、リンパ球、単球、マクロファージ、樹状細胞、ならびに顆粒球、例えば、好中球、好酸球、および好塩基球などがある。抗原の例としては、限定することなく、タバコの煙などの煙、大気汚染、溶接からの煙霧などの煙霧、シリカ粉塵ならびに職場の粉塵、例えば、採炭および産金で見られるものなどを含めた粉塵、化学物質、例えば、カドミウムおよびイソシアネートなどがある。敏感な個体においてＣＯＰＤを悪化させ得る、公知のアレルゲンならびに感染エージェント、例えば、細菌およびウイルスなど、またはリポ多糖（ＬＰＳ）を含めた抗原も含まれる。

【０２７６】

ある特定の実施形態は、口、食道、胃、小腸、大腸、および直腸に関連した炎症、感染、およびがんを含めた、胃腸系に関連した炎症反応および状態を低減することに関する。「胃腸の炎症」は、本明細書において使用する場合、胃腸管の粘膜層の炎症を指し、急性および慢性炎症状態を包含する。急性炎症は一般に、短時間の発症、および好中球の浸潤または流入によって特徴付けられる。慢性炎症は一般に、相対的により長い期間の発症、および単核細胞の浸潤または流入によって特徴付けられる。慢性炎症は一般に、自然寛解および自然発生の期間によっても特徴づけることができる。

【０２７７】

「胃腸管の粘膜層」は、腸（小腸および大腸を含む）、直腸、胃（stomach）（胃（gastric））の内層、口腔などの粘膜を含むことを意味する。「慢性の胃腸の炎症」は、相対的により長い期間の発症によって特徴付けられ、持続性であり（例えば、数日、数週間、数カ月、または数年から、最大で被験体の生涯まで）、単核細胞の浸潤または流入に関連することが多く、自然寛解および自然発生の期間にさらに関連付けることができる、胃腸管の粘膜の炎症を指す。このような慢性炎症を有する「慢性胃腸炎症状態」（「慢性胃腸炎症疾患」とも呼ばれる）としては、それだけに限らないが、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、外界からの侵襲によって誘導される大腸炎（例えば、治療レジメン、例えば、化学療法、放射線療法などに関連した胃腸の炎症）、慢性肉芽腫症などの状態における大腸炎（例えば、Schappiら、Arch Dis Child.、８４巻：１４７～１５１頁、２００１年を参照）、セリアック病、セリアックスプルー（即ち、腸の内層がグルテンとして公知のタンパク質の摂取に応答して炎症性である遺伝性疾患）、食物アレルギー、胃炎、感染性胃炎または全腸炎（例えば、Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉに感染した慢性活動性胃炎）、および感染エージェントによって引き起こされる他の形態の胃腸の炎症、ならびに他の同様の状態がある。

【０２７８】

本明細書において使用する場合、「炎症性腸疾患」または「ＩＢＤ」は、腸のすべてまたは一部の炎症によって特徴付けられる様々な疾患のいずれかを指す。炎症性腸疾患の例としては、それだけに限らないが、クローン病および潰瘍性大腸炎がある。用語ＩＢＤは、偽膜性大腸炎、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群の大腸炎、コラーゲン蓄積大腸炎、虚血性大腸炎、放射線大腸炎、薬物で、および化学的に誘導される大腸炎、便流変更性大腸炎、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、過敏性大腸症候群、ならびにクローン病、ならびにクローン病の中で、活性、難治性、および瘻孔性（fistulizing）クローン病を含めたすべてのサブタイプがある。したがって、ＨＲＳポリペプチドを使用して、これらの状態の任意の１種または複数を処置または管理することができる。

【０２７９】
ある特定の実施形態は、血管系に関連した炎症反応および状態、または血管および心臓に関連した炎症などの血管炎症を低減することに関する。血管系関連炎症状態の例としては、限定することなく、心筋炎、心膜炎、閉塞性疾患、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、血栓症、自己免疫性腸症、心筋症、川崎病、若年性特発性関節炎、ウェジナー肉芽腫症、高安動脈炎、川崎症候群、抗第ＶＩＩＩ因子自己免疫疾患、壊死性小血管血管炎、顕微鏡的多発性血管炎、チャーグストラウス症候群、ｐａｕｃｉ－ｉｍｍｕｎｅ型巣状性壊死性糸球体腎炎、半月形糸球体腎炎、抗リン脂質抗体症候群、抗体誘導性心不全、血小板減少性紫斑病、自己免疫性溶血性貧血、シャーガス病における心臓自己免疫、および抗ヘルパーＴリンパ球自己免疫がある。心内膜炎、または血流を通った細菌の小クラスターの伝播による心臓弁の感染、静脈炎（phlebitis）または血管炎、１種もしくは複数の静脈の炎症、および血栓に関係した静脈炎（vein inflammation）である血栓静脈炎（thrombophlebitis）も含まれる。血栓静脈炎は、異なる位置で繰り返して起こる場合があり、そのとき、移行性血栓性静脈炎または遊走性血栓静脈炎と呼ばれる。静脈炎は、細菌感染、化学剤への曝露、例えば、刺激性または発疱性溶液など、挿入の間の静脈内へのカニューレの移動などの皮膚穿刺からの身体的外傷、投薬、例えば、セレブレックス、オランザピン（Olanzepine）、抗うつ剤など、およびアルコール依存症などの様々な原因に関連付けることができる。ある特定の実施形態は、急性リウマチ熱、先天性トキソプラスマ症、エンテロウイルス出産前感染（enterovirus antenatal infection）、ライム病、およびリウマチ熱の任意の１種または複数によって引き起こされる心炎を処置または管理することに関する場合がある。

【０２８０】
ある特定の実施形態は、急性および慢性肝臓炎症、ならびに急性および慢性胆嚢炎（cholecystis）を含めた、肝臓または胆嚢に関連した炎症反応ならびに状態を低減することに関する。肝臓または胆嚢関連炎症状態の例としては、限定することなく、自己免疫性肝炎、ウイルス性肝炎（例えば、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ｄ型肝炎ウイルス、Ｅ型肝炎ウイルス、単核球症、風疹、エプスタイン－バーウイルス、およびサイトメガロウイルス）、肝炎の他の原因、例えば、重度の細菌感染、アメーバ感染、薬（例えば、アゴメラチン、アロプリノール、アミトリプチリン（amitryptyline）、アミオダロン、アザチオプリン（asathioprine）、パラセタモール、ハロタン、イブプロフェン、インドメタシン、イソニアジド、リファンピシン、ピラジナミド、ケトコナゾール、ロラタジン、メトトレキセート、メチルドパ、ミノサイクリン、ニフェジピン、ニトロフラントイン、フェニトイン、バルプロ酸、トログリタゾン、ジドブジン）、毒素（例えば、アルコール、真菌毒素）、ならびに代謝異常（例えば、ウィルソン病、体の銅代謝の障害、ヘモクロマトーシス、体の鉄代謝の障害、非アルコール性脂肪性肝炎、アルファ１－アンチトリプシン欠損）などがある。追加の例としては、非アルコール性脂肪肝疾患、原発性胆汁性肝硬変などの硬変、閉塞性黄疸、虚血性肝炎、および胆嚢疾患がある。

【０２８１】
ある特定の実施形態は、リンパ系／免疫系に関連した炎症反応および状態を低減することに関する。リンパ系／免疫系関連炎症状態の例としては、限定することなく、自己免疫疾患、例えば、自己免疫性溶血性貧血および様々なリンパ節症に加えて、シャーガス病、慢性閉塞性肺障害（ＣＯＰＤ）、クローン病、皮膚筋炎、糖尿病Ｉ型、子宮内膜症、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本病（Hachimoto's disease）、汗腺膿瘍、川崎病、ＩｇＡ腎症、（特発性）血小板減少性紫斑病、間質性膀胱炎、エリテマトーデス、混合性結合組織病、モルヘア、重症筋無力症、ナルコレプシー、神経性筋強直症、尋常性天疱瘡、悪性貧血（pernicous anemia）、乾癬、乾癬性関節炎、多発性筋炎（poliomyositis）、原発性胆汁性肝硬変、関節リウマチ、統合失調症、強皮症、シェーグレン症候群、スティッフパーソン症候群、側頭動脈炎、潰瘍性大腸炎、白斑、およびウェジナー肉芽腫症などがある。

【０２８２】
移植片、組織、細胞、または臓器の移植に関連した免疫関連炎症状態、例えば、移植片拒絶、慢性移植片拒絶、亜急性移植片拒絶、超急性移植片拒絶、急性移植片拒絶、および移植片対宿主疾患なども含まれる。ある特定の実施形態では、ＡＡＲＳポリペプチドを、組織を取り出す前または間に移植ドナーに投与することができる。ある特定の実施形態では、移植療法の炎症関連合併症を低減するために、移植療法の前、間、および／または後に、ＨＲＳポリペプチドを移植レシピエントに投与することができる。移植療法の例としては、当技術分野で公知のものの中でも、骨髄、幹細胞、末梢血、肝臓、肺、心臓、皮膚、および腎臓がある。追加の例としては、アレルギーに関連した炎症状態、例えば、喘息、じん麻疹（hives）、じん麻疹（urticaria）、花粉アレルギー、塵ダニアレルギー、毒アレルギー、化粧品アレルギー、ラテックスアレルギー、化学アレルギー、薬物アレルギー、虫刺されアレルギー、動物の鱗屑アレルギー、刺性植物（stinging plant）アレルギー、ツタウルシアレルギー、および食物アレルギーなどがある。

【０２８３】
ある特定の実施形態は、泌尿生殖器系に関連した炎症反応および状態を低減することに関する。泌尿生殖器系関連炎症状態の例としては、限定することなく、尿管、膀胱、尿道、子宮頸、ファロピウス管、卵巣、子宮、胎内、外陰部、前立腺、尿道球腺、精巣上体、前立腺、精嚢、精巣、または腎臓の炎症、感染、またはがんがある。自己免疫性間質性腎炎、腎膿瘍（腎内または腎外）、急性前立腺炎、血尿、尿道炎（例えば、クラミジアおよび他の性感染症）、骨盤内炎症性疾患（ＰＩＤ）、ならびに前立腺膿瘍も含まれる。糸球体腎炎、ループス腎炎、腎症、痛風、毒物または化学物質（例えば、エーテル、硫酸タリウム）、ある特定の医薬品（例えば、ピロキシカム、カンジル（candyl）、フェルデンゲル（feldene gel）、フェンサイド、ピロクス）、ヘルマン症候群、黄熱病、免疫複合体疾患、腸チフス、尿道狭窄、腎結核（renal tuberculosism）、および連鎖球菌感染後糸球体腎炎の１種または複数に関連した腎炎も含まれる。

【０２８４】
ある特定の実施形態は、筋骨格系に関連した炎症反応および状態を低減することに関する。炎症状態に関連した筋骨格系の例としては、限定することなく、関節炎、例えば、関節リウマチおよび乾癬性関節炎など、強直性脊椎炎、自己免疫性筋炎、原発性シェーグレン症候群、平滑筋自己免疫疾患、筋炎、多発性筋炎、腱炎、靱帯の炎症、軟骨の炎症、関節の炎症、滑膜炎、手根管症候群、慢性筋肉炎症、ならびに骨粗鬆症および骨関節炎に関連した骨の炎症を含めた骨の炎症がある。ティーツェ症候群、肋胸骨、胸鎖、または肋軟骨の関節の良性、有痛性、非化膿性限局性腫脹、肋軟骨炎、胸骨筋症候群、剣状突起痛、自発的胸鎖亜脱臼、胸肋鎖骨過形成症、線維筋痛症、肩腱炎または滑液包炎、痛風関節炎、リウマチ性多発性筋痛、エリテマトーデス、骨棘、疲労骨折などの骨折、悪液質（cachexia）、筋肉減少症、筋力低下、筋肉消耗性疾患、筋傷害、筋肉痛、散発性封入体ミオパチー、遺伝性封入体ミオパチー、およびサルコグリカン欠損も含まれる。筋ジストロフィー（例えば、ＤＭＤ）、筋緊張性ジストロフィー、横紋筋融解症、および本明細書に記載の他の筋肉炎症疾患も含まれる。

【０２８５】
ある特定の実施形態は、内分泌系に関連した炎症反応および状態を低減することに関する。内分泌系関連炎症状態の例としては、限定することなく、視床下部、下垂体、甲状腺、膵臓、または副腎に関連した炎症、感染、またはがん、膵臓病などの腺疾患、Ｉ型糖尿病などの糖尿病、甲状腺疾患、グレーブス病、甲状腺炎、自発的自己免疫性甲状腺炎、橋本甲状腺炎、（特発性）粘液水腫、卵巣自己免疫、自己免疫性抗精子不妊、自己免疫性前立腺炎、およびＩ型自己免疫性多腺症候群がある。

【０２８６】
ある特定の実施形態は、免疫、炎症を含めた生理的および病理的プロセスの制御における積極的なパティシパントである脂肪組織に関連した炎症反応および状態、ならびにリポジストロフィー、ラミノパチー、川崎病、若年性特発性関節炎、リソソーム蓄積病、およ

びムコ多糖症に関連した炎症状態を低減することに関する。

【０２８７】

マクロファージは、脂肪組織の成分であり、その活性に積極的に参加する。さらに、リンパ球と脂肪細胞との間のクロストークは、免疫制御をもたらし得る。脂肪組織は、アディポカイン、レプチン、アディポネクチン、レジスチン、およびビスファチン、ならびにサイトカインおよびケモカイン、例えば、ＴＮＦ－アルファ、ＩＬ－６、単球走化性タンパク質１などを含めた様々な炎症促進性因子ならびに抗炎症因子を産生ならびに放出する。脂肪組織によって産生される炎症促進性分子は、インスリン抵抗性の発生、および肥満に関連した心血管疾患のリスクの増大における積極的なパティシパントとして関係付けられている。対照的に、レプチンレベルの低減は、栄養不良の個体におけるＴ細胞応答の低減によって引き起こされる感染への感受性の増大の素因となり得る。アディポカインレベルの変化は、様々な炎症状態において観察されている（例えば、Fantuzzi、Ｊ Allergy Clin Immunol.、１１５巻：９１１～１９頁、２００５年；およびBergら、Circulation Research.、９６巻：９３９頁、２００５年を参照）。

【０２８８】

ＨＲＳポリペプチドは、過敏症に関連した炎症を処置または管理するのにも使用することができる。このような状態の例としては、Ｉ型過敏症、ＩＩ型過敏症、ＩＩＩ型過敏症、ＩＶ型過敏症、即時型過敏症、抗体媒介性過敏症、免疫複合体媒体性過敏症、Ｔ－リンパ球媒介性過敏症、および遅延型過敏症がある。

【０２８９】

ＨＲＳポリペプチドは、自己炎症状態を処置または管理するのにも使用することができる。自己炎症状態の例としては、家族性地中海熱、ＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）、Ｈｙｐｅｒ－ＩｇＤ症候群（ＨＩＤＳ）、ＣＩＡＳＩ関連疾患、例えば、マックル－ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症症候群、および新生児期発症多臓器系炎症性疾患など、ＰＡＰＡ症候群（化膿性無菌性関節炎、壊疽性膿皮症、ざ瘡）、ならびにＢｌａｕ症候群がある。

【０２９０】

ＨＲＳポリペプチドは、様々ながんに関連した炎症を処置または管理するのに使用することができる。このようながんの例としては、限定することなく、前立腺がん、乳がん、大腸がん、直腸がん、肺がん、卵巣がん、精巣がん、胃がん、膀胱がん、膵がん、肝がん、腎がん、脳腫瘍、黒色腫、非黒色腫皮膚がん、骨がん、リンパ腫、白血病、甲状腺がん、子宮内膜がん、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、神経芽細胞腫、グリア芽細胞腫、および非ホジキンリンパ腫がある。

【０２９１】

上述したように、ある特定の実施形態は、全身性炎症を低減または管理するなど、全身性炎症を調節するのにＨＲＳポリペプチドを使用する場合がある。ある特定の実施形態では、全身性炎症は、様々な潜在的な原因を有する体全体の炎症状態である全身性炎症反応症候群（ＳＩＲＳ）に関連付けることができる。ＳＩＲＳは、日常の診断技法に従って特徴付け、または同定することができる。一非限定例として、ＳＩＲＳは、以下のうちの２種以上の存在によって同定することができる：（ｉ）３６℃未満または３８℃超である体温、（ｉｉ）１分当たり９０拍超の心拍数、（ｉｉｉ）１分当たり２０回超の呼吸を伴った頻呼吸（高呼吸数）；または４．３ｋＰａ（３２ｍｍＨｇ）未満の二酸化炭素の動脈分圧、および（ｉｖ）４０００細胞／mm^3（4×10^9細胞／Ｌ）未満、もしくは１２，０００細胞／mm^3（12×10^9細胞／Ｌ）超の白血球数；または１０％超の未成熟好中球（帯状体）の存在。

【０２９２】

ＳＩＲＳは、感染性または非感染性として広く分類される。最も一般に、感染性ＳＩＲＳは、菌血症、ウイルス血症、寄生虫血症、および毒素ショック症候群を含む、分かっている、または疑わしい感染と組み合わせた体全体の炎症状態である敗血症に関連する。敗血症は、限定することなく、細菌、例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃ

ｔｉａｅ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、クレブシエラ種、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、エンテロバクター種、Ｓ．ａｇａｌａｃｔｉａｅ、セラチア種、アシネトバクター種、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、サルモネラ種、およびＮｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓなど；ウイルス、例えば、風疹、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、および水痘ウイルスなど；寄生虫、例えば、マラリア感染｛例えば、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、トリパノソーマ症、およびフィラリア症など；ならびに真菌、例えば、カンジダ種、アスペルギルス種、ヒストプラズマ種、Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ、Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓ、Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ、およびＰｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｉｎｉｉなどを含めた多種多様な感染エージェントに関連付けることができる。ある特定の場合では、肺（例えば、肺炎）、膀胱および腎臓（例えば、尿路感染）、皮膚（例えば、蜂巣炎）、腹部（例えば、虫垂炎）、ならびに他の範囲（例えば、髄膜炎）における感染が広がり、敗血症をもたらす場合があり、ＨＲＳポリペプチドを使用して、敗血症が存在するか、またはその他であるかにかかわらず、これらの感染エージェントのいずれかに関連した炎症を調節することができる。

【０２９３】

非感染性ＳＩＲＳは、とりわけ、外傷、火傷、膵炎、虚血、出血、外科合併症、副腎不全、肺塞栓症、大動脈瘤、心タンポナーデ、アナフィラキシー、および薬物過剰摂取に関連付けることができる。ＳＩＲＳは、本明細書に記載のものを含めた、１種または複数種の臓器または臓器系の不具合によって複雑化されることが多い。具体例としては、とりわけ、急性肺傷害、急性腎傷害、ショック、および多臓器不全症候群がある。一般に、ＳＩＲＳは、基本的な問題（例えば、血液量減少に対して十分な水分補給、膵炎に対してＩＶＦ／ＮＰＯ、アナフィラキシーに対してエピネフリン／ステロイド／ベナドリル）に集中することによって処置される。ある特定の場合では、セレン、グルタミン、およびエイコサペンタエン酸が、ＳＩＲＳの症状の改善において有効性を示しており、ビタミンＥなどの抗酸化剤も有用であり得る。したがって、ＨＲＳポリペプチドを、単独で、または他の療法を組み合わせて使用して、ＳＩＲＳおよびＳＩＲＳの合併症を処置または管理することができる。

【０２９４】

全身性炎症は、サイトカインと免疫細胞との間の正のフィードバックループによって引き起こされ、様々なサイトカインのレベルを高度に上昇させる危険な免疫反応である「サイトカインストーム」にも関連付けることができる。ある特定の場合では、サイトカインストーム（高サイトカイン血症）は、多数の公知の炎症性メディエーター、例えば、サイトカイン、酸素フリーラジカル、および凝固因子などの全身放出を含む。炎症促進性サイトカイン、例えば、ＴＮＦ－アルファ、ＩＬ－１、およびＩＬ－６など、ならびに抗炎症性サイトカイン、例えば、ＩＬ－１０およびＩＬ－１受容体アンタゴニストなどのレベルの上昇が含まれる。サイトカインストームは、移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、敗血症、トリインフルエンザ、天然痘、およびＳＩＲＳを含めた、いくつかの感染症および非感染症において起こり得る。サイトカインストームは、ある特定の投薬によっても誘導され得る。処置としては、Ｔ細胞応答を低減するＯＸ４０ＩＧや、ＡＣＥ阻害剤、アンギオテンシンＩＩ受容体遮断薬、コルチコステロイド、ゲムフィブロジル、フリーラジカルスカベンジャー、およびＴＮＦ－ａ遮断薬がある。したがって、ＨＲＳポリペプチドは、単独で、または他の療法と組み合わせて使用して、サイトカインストームを処置または管理することができる。

【０２９５】

ある特定の実施形態は、肉芽腫性炎症、線維素性炎症、化膿性炎、漿液性炎、または潰瘍性炎症の任意の１種または複数を低減するのにＨＲＳポリペプチドを使用する場合があ

る。肉芽腫性炎症は、肉芽腫の形成によって特徴付けられ、一般に、感染エージェントに対する応答、例えば、結核、ライ病、および梅毒から生じる。線維素性炎症は、線維素が血管を通過することを可能にする、血管透過性の大きな増大から生じる。がん細胞などの適切な凝固促進性（pro-coagulative）スティミュラスが存在する場合、線維性滲出液が堆積される。このプロセスは一般に、漿膜腔内で見られ、そこで線維性浸出物の瘢痕への変換が漿膜同士間で起こり得、これらの機能を制限する。化膿性炎は、好中球、死細胞、および体液からなる大量の膿汁の形成から生じる。ブドウ球菌などの化膿菌による感染は、この種類の炎症に特徴的である。周囲組織によって囲まれている膿汁の大きな局在的なコレクションは、膿瘍と呼ばれる。漿液性炎は、一般に漿膜の中皮細胞によって産生されるが、血漿からも由来し得る非粘性漿液の多量の滲出によって特徴付けられる。このタイプの炎症の例としては、皮膚疱疹がある。一般に上皮付近で起こる潰瘍性炎症は、表面からの組織の壊死性の喪失をもたらし、それによって組織のより下の層を曝露する。引き続く上皮の掘削は、潰瘍として公知である。

【０２９６】

ＨＲＳポリペプチドは、身体的な傷害または創傷の処置においても使用することができる。例としては、剥離、打撲傷、切り傷、刺し傷、裂傷、衝突傷、振盪、挫傷、熱傷、凍傷、化学火傷、日焼け、壊疽、ネクローシス、乾燥、放射線熱傷、放射能熱傷、煙の吸入、筋断裂、肉離れ、腱断裂、引っ張られた腱、引っ張られた靭帯、靭帯断裂、過伸展、軟骨断裂、骨折、挟まれた神経、潰瘍、および発砲または他の外傷性創傷がある。

【０２９７】

ＨＲＳポリペプチドは、特発性炎症または未知の病因の炎症を処置または管理するのにも使用することができる。１種または複数種のＡＡＲＳポリペプチドが、一般に利用可能で当技術分野で公知である療法を含めた、本明細書に記載の炎症疾患または状態のいずれかのための１種または複数種の他の療法と組み合わせて投与または利用される併用療法も含まれる。併用療法の例としては、標準的な抗炎症剤、例えば、非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、免疫選択的抗炎症誘導体（ＩｍＳＡＩＤ）、およびステロイド（例えば、コルチコステロイド）など、抗感染薬、例えば、抗生物質および抗ウイルス剤など、抗酸化剤、サイトカイン、化学療法剤、ならびに他の抗がん療法、ならびに免疫抑制療法の使用がある。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、本発明は一般に、生体適合性固体支持体に結合したＨＲＳポリペプチドを使用して、内因性抗体の体外除去を促進するための方法および組成物に関する。

【０２９９】

固定化された抗原を使用する体外免疫吸着による循環抗体の特異的除去は、様々な研究者によって記載されている。一般に、Koehlerら、（２０１１年）Ｊ Clin Apher、（６号）：３４７～５５頁；Muellerら、（２０１２年）Dermatology.、２２４巻（３号）：２２４～７頁；Koziolekら、（２０１２年）Ｊ Neuroinflammation.、９巻（１号）：８０頁；Bontadiら、（２０１２年）Ｊ Clin Apher.、doi: 10.1002/jca.21229；Westermannら、（２０１２年）Ｊ Dermatol.、３９巻（２号）：１６８～７１頁を参照。さらに、この手法は、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ、Ｓｔ．Ｗｅｎｄｅｌ、ドイツが販売する商標Ｐｒｏｓｏｒｂａ（登録商標）、Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂａ（登録商標）、およびＫａｎｅｋａ、Ｗｉｅｓｂａｄｅｎ、ドイツが販売するＳｅｌｅｓｏｒｂ（登録商標）の下で販売されている免疫吸着カラムによって例示されるように、循環抗体を特異的に除去するための実行可能なシステムとして順調に商品化されている。

【０３００】

体外免疫吸着では、循環抗体は、内因性抗体に特異的な免疫吸着カラムを使用して体外で除去される。患者から血液が連続的に、または不連続に引き抜かれ、その細胞成分および血漿に分離され、血漿が、抗体を除去するために免疫吸着材料に通して潅流される。次いで血液の処理された血漿および細胞成分が、別個に、または同時に患者中に再注入され

る。いくつかの実施形態では、本発明による体外免疫吸着は、ＨＲＳポリペプチドを投与する直前に実施することができる。

【０３０１】

したがって、ある特定の実施形態は、細胞外体液から抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体を体外免疫吸着させるための方法であって、（ａ）被験体から得られた細胞外体液を準備するステップと、（ｂ）細胞外体液を、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドが付着した生体適合性固体支持体と接触させ、それによって抗ＨＲＳ抗体を捕捉するステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）からの細胞外体液を被験体中に再注入するステップとを含む、方法に関する。

【０３０２】

被験体の体液から抗ＨＲＳ抗体を除去するのに使用するための免疫吸着組成物であって、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドが付着した生体適合性固体支持体を含む、免疫吸着組成物も含まれる。

【０３０３】

一般に、これらの免疫吸着法および組成物のいずれにおいても、体液は、当業者に周知である方法およびシステムを使用して、取得され、取り扱われ、再注入される。例えば、血液は、例えば、生体適合性固体支持体を含有する容器に適当なチューブを介して接続された末梢静脈中に導入された針を介して引き抜かれ、別の静脈中に挿入された針に接続されたインレットチューブを介して患者中に再注入される。被験体から大量に引き抜かれる状況では、血液は、例えば、鎖骨下静脈から引き抜くことができる。

【０３０４】

血液または血漿は、抗体と支持体に結合したＨＲＳポリペプチドとの間の結合を促進する条件下で、生体適合性固体支持体と接触されることになる。体外吸着のための適当なカラムおよび灌流システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ、Ｓｔ．Ｗｅｎｄｅｌ、ドイツから市販されている。３５℃～約４０℃の範囲の接触温度が一般に使用される。接触時間は一般に、約１～約６時間の範囲内となる。次いで、血液または血漿の非結合部分が、収集されて患者中に再導入され、またはこれを連続的に直接再導入することができる。手順の前および／または後に、被験体のＪｏ－１抗体価をイムノアッセイによって監視して、手順の効率を監視することができる。

【０３０５】

必要に応じて、血液の凝固を防止するために、体から引き抜かれる際、血液に抗凝固物質、例えば、クエン酸ナトリウム、ヘパリン、またはデキストランなどを添加することができる。デキストランは、血液の粘度を低減し、生理食塩水の添加と組み合わせて、血液細胞と血小板との間の距離の増大を保証する。このような抗凝固剤は、血液の非凝固に十分な量で添加することができる。被験体中に処理された血液を再注入する前に、例えば、ヘパリンの抗凝固効果を、適切な量のヘパリナーゼ、プロタミン、および／またはビタミンＫなどを用いて低減してもよい。

【０３０６】

塞栓症のリスクを低減するために、吸着媒粒子が再注入の際に患者に入るのを回避するための対策をとることができる。したがって、粒子捕捉デバイスは一般に、体液の残りが患者に戻される前にその残りからいずれの残留粒子も除去するために、吸着媒体容器の下流で使用される。粒子捕捉デバイスは、体液の吸着されなかったエンティティを通過させながら、吸着媒体の任意の粒子材料を保持するサイズの開口部を有するフィルターまたはメッシュとすることができる。体外血液灌流は、連続的に実施することができ、または代わりに、別個の体積の血液を患者から取り出し、上述したように処理し、血液の処理された血漿および細胞成分を、処理が完了した後に、患者に戻してもよい。

【０３０７】

多種多様な材料が、これらの免疫吸着法および組成物のいずれかにおいて使用するための生体適合性固体支持体として適当となり、理想的には、支持マトリックスは、機械的に強く、タンパク質の非特異的結合を回避するのに十分親水性であり、血液および他の水溶

液に対して安定であり、これらに適合していることになる。適当な生体適合性マトリックス材料としては、例えば、ビーズ、繊維状、シート、または中空糸を含めた様々な形態での、合成および天然のポリマー、多糖、ポリアミド、ガラスビーズ、微粒子シリカ、多孔質ガラス、シリカ、樹脂や、アクリルアミド誘導体、メタクリルアミド誘導体、またはポリスチレン誘導体などを含めた合成マトリックスがある。

【０３０８】

例示的なポリマーとしては、寒天、アルギネート、カラギーナン、グアーガム、アラビアガム、ガティガム、トラガカントガム、カラヤガム、ローカストビーンガム、キサンタンガム、アガロース、セルロース、ペクチン、ムチン、デキストラン、デンプン、ヘパリン、キトサン、ヒドロキシデンプン、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルデンプン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースを含めた、天然および合成多糖、ならびに他の炭水化物系ポリマーがある。アクリル酸ポリマー、ポリアミド、ポリイミド、ポリエステル、ポリエーテル、高分子ビニル化合物、ポリアルケン、およびこれらの置換誘導体を含めた合成有機ポリマー、およびポリマーをもたらすモノマー、ならびに１つを超えるこのようなポリマー機能性を含むコポリマー、およびこれらの置換誘導体、ならびにこれらの混合物。

【０３０９】

これらの体外方法および組成物のいずれにおいても、ＨＲＳポリペプチドは一般に、生体適合性固体支持体に共有結合的にカップリングされており、ＨＲＳポリペプチドなどのタンパク質をカップリングするための標準方法は、当業者に周知である（例えば、Affinity Chromatography, Principles and Methods（Pharmacla-LKB）、Dean,P.G.ら編、１９８５年、Affinity Chromatography: A practical approach、IRL Press、Oxford、およびScouten, W.H.、１９８１年、Affinity Chromatography、Wiley Intersclence、New York、Hermansonらによる「Immobilized Affinity Ligand Techniques」、Academic Press, Inc.、San Diego、１９９２を参照）。生体適合性固体支持体を誘導体化（活性化）して、ＨＲＳポリペプチド内の１つまたは複数の官能性化学基と反応することができる反応性物質を形成し、それによって、ＨＲＳポリペプチドを生体適合性固体支持体にカップリングするための化学共有結合を形成することができる。したがって、ヒドロキシル、アミノ、アミド、カルボキシル、またはチオール基を含む材料を、様々な活性化化学物質、例えば、臭化シアン、ジビニルスルホン、エピクロロヒドリン、ビスエポキシラン、ジブロモプロパノール、グルタル酸ジアルデヒド、カルボジイミド、アンヒドリド、ヒドラジン、過ヨウ素酸塩、ベンゾキノン、トリアジン、トシレート、トレシレート、および／またはジアゾニウムイオンなどの化学物質を使用して、活性化または誘導体化することができる。

【０３１０】

これらの方法および組成物のいずれかにおいて使用するための具体的な、例示的な活性化された生体適合性固体支持体としては、例えば、ＣＮＢｒ－セファロース、セルロース、例えば、ＣＮＢｒ－活性化Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４Ｂ（Ａｍｅｒｓｈａｍ）、またはエポキシ活性化アガロース（Ｓｉｇｍａ）などがある。生体適合性スペーサーを含むもの（例えば、ＮＨＳ－活性化Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗのような）、または含まないもの（例えば、ＣＮＢｒ－活性化Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４Ｂのような）を使用することができ、これらは、市販されており、このような材料をＨＲＳポリペプチドにカップリングするための方法は、当技術分野で周知であり、製造者の指示に基づいて日常の実験によって最適化することができる。

【０３１１】

これらの体外方法および組成物のいずれかにおいて使用するための適当なＨＲＳポリペプチドとしては、表１～９に列挙された、もしくはこれらから導き出せるＨＲＳポリペプチドのいずれか、または配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかがあり、ＨＲＳポリペプチドは、抗Ｊｏ－１抗体によって認識される少なくとも１種のエピトープを含む。いくつかの実

施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、全長ＨＲＳ、ＨＲＳ（１～５０６）、ＨＲＳ（２～５０６）、およびＨＲＳ（１～６０）から選択される。

【０３１２】

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素由来ポリペプチド

本発明の実施形態は一般に、例えば、抗炎症剤、抗体ブロッキング剤、および／もしくは免疫制御剤としてのヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素由来ポリペプチド（ＨＲＳポリペプチド）、または代替タンパク質の使用に関する。ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素は、クラスＩＩ　ｔＲＮＡ合成酵素ファミリーに属し、これは、３つの高度に保存された配列モチーフを有する。クラスＩおよびＩＩ　ｔＲＮＡ合成酵素は、２ステップ反応でその同族ｔＲＮＡへのアミノ酸の特異的付着を担うとして広く認識されている。アミノ酸（ＡＡ）がＡＴＰによって最初に活性化されてＡＡ－ＡＭＰを形成し、次いでｔＲＮＡのアクセプター末端に移動される。細胞質ゾル型全長ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素は一般に、細胞質ゾル型ホモ二量体、または選択的にスプライスされたミトコンドリア型として存在する。

【０３１３】

より最近、真核生物ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（フィシオクリンもしくはＨＲＳポリペプチド）のいくつかの生物学的断片もしくは代わりにスプライスされたアイソフォーム、またはいくつかコンテクストにおいて、インタクトな合成酵素は、ある特定の細胞シグナル伝達経路を調節し、または抗炎症性を有することが確認された。これらの活性は、タンパク質合成におけるｔＲＮＡ合成酵素の古典的な役割と異なり、一括して「非カノニカル活性」として本明細書で呼ぶ。これらのフィシオクリンは、代替スプライシングまたはタンパク質分解によって天然に産生され得、細胞自律的様式（即ち、宿主細胞内）、または非細胞自律的様式（即ち、宿主細胞の外側）で作用して、様々な恒常性維持機構を制御することができる。例えば、本発明で提供される場合、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素のＮ－末端断片などのＨＲＳポリペプチド（例えば、ＨＲＳ（１～４８）、ＨＲＳ（１～６０））は、とりわけ、ｉｎ　ｖｉｖｏで活動性炎症部位への炎症細胞の遊走を遮断することによって、抗炎症シグナルを発揮することができる。さらに、全長ＨＲＳポリペプチド配列と比べたある特定の変異または欠失（例えば、ＨＲＳ（１～５０６））は、野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素と比較して、活性を増大させ、かつ／または薬理学的性質、安定性、および／もしくは均一性を改善する。例示的なＨＲＳポリペプチドの配列を表Ｄ１に提供する。

【０３１４】

【表Ｄ１－１】

表D1 例示的なHRSポリペプチド			
名称	タイプ/ 種 /残基	アミノ酸および核酸の配列	配列 番号
N末端フィシオクリン			
全長細胞質ゾル型野生型	タンパク質/ヒト/	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVND RRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKNEMVG EKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALE GLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLL QTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGL SIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQE LKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	1
全長ミトコンドリア型野生型	タンパク質/ヒト/	MPLLGLLPRRAWASLLSQLLRPPCASCTGAVRCQSQVAEAVL TSQLKAHQEKPNFIIKTPKGTRDLSPQHMVVREKILDLVISCFK RHGAKGMDTPAFELKETLTEKYGEDSGLMYDLKDQGGELLS LRYDLTVPFARYLAMNKVKKMKRYHVGKVWRRESPTIVQGR YREFCQCDFDIAGQFDPMIPDAECLKIMCEILSGLQLGDFLIKV NDRRIVDGMFAVCGVPESKFRAICSSIDKLDKMAWKDVRHE MVVKKGLAPEVADRIGDYVQCHGGVSLVEQMFQDPRLSQNK QALEGLGDLKLLFEYLTLFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYE AVLLQTPTQAGEEPLNVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGHKVP CVGLSIGVERIFYIVEQRMKTKGEKVRTTETQVFVATPQKNFL QERLKLIAELWDSGIKAEMLYKNNPKLLTQLHYCESTGIPLVV	39

【表Ｄ１－２】

		IIGEQELKEGVIKIRSVASREEVAIKRENFVAEIQKRLSES	
HisRS1^{N1}	タンパク質/ヒト/ 1-141	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAM	2
HisRS1^{N2}	タンパク質/ヒト/ 1-408	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVND RRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKNEMVG EKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALE GLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLL QTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGL SIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTE	3
HisRS1^{N3}	タンパク質/ヒト/ 1-113	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKL	4
HisRS1^{N4} (リゾカイン; SV9; HRS(1-60))	タンパク質/ヒト/ 1-60	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPK	5
HisRS1^{N5}	タンパク質/ヒト/ 1-243 + 27aa	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVND RRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVGYPWWNSCSRIL NYPKTSRPWRAWET	6
C末端フィシオクリン			
名称	タイプ/種/残基	アミノ酸および核酸の配列	配列番号
HisRS1^{C1}	タンパク質/ヒト/ 405-509	RTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVR REDLVEEIKRRTGQPLCIC	7
HisRS1^{C2}	タンパク質/ヒト/ 1-60 + 175-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDK VSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLL QDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARG LDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVG MFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQY CEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEI KRRTGQPLCIC	8
HisRS1^{C3}	タンパク質/ヒト/ 1-60 + 211-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTIC SSVDKLDKVSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGG VSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISF DLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGR YDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKL LNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRRE DLVEEIKRRTGQPLCIC	9
HisRS1^{C4}	タンパク質/ヒト/ 1-100 + 211-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVD KLDKVSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLV EQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSL	10

【表Ｄ１－３】

		ARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDG LVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTET QVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLV EEIKRRTGQPLCIC	
HisRS1^{C5}	タンパク質/ ヒト/ 1-174 + 211-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEE VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKL SQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYT GVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPK GRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQ KKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAG IPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPLCIC	11
HisRS1^{C6}	タンパク質/ ヒト/ 1-60 + 101- 509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGEL LSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRG RYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVK VNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKNE MVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNK QALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYE AVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLLEE RLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAII GEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	12
HisRS1^{C7}	タンパク質/ ヒト/ 1-100 + 175-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQI GDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK LSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYY TGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDP KGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVASA QKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEA GIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPLCIC	13
HisRS1^{C8}	タンパク質/ ヒト/ 1-60 + 399- 509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKALEEKIRTTETQVLVASAQKKLLEE RLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAII GEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	14
HisRS1^{C9}	タンパク質/ ヒト/ 1-100 + 399-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGAEVIDTPVFELKALEEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLK LVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQ ELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	15
HisRS1^{C10}	タンパク質/ ヒト/ 369-509	MFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQY CEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEI KRRTGQPLCIC	16
内部フィシオクリン			
名称	タイプ/ 種 /残基	アミノ酸および核酸の配列	配列 番号
HisRS1^{I1}	タンパク質/ ヒト/ 191-333	CLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTI CSSVDKLDKVSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQH GGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDD KISFDLSLARGLDYYTG	17

【０３１５】

ヒト遺伝子のいくつかの天然に存在するヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素一塩基多型（ＳＮＰ）および天然に存在するバリアントは、配列決定されており、少なくとも部分的に機能的に互換性であることが当技術分野で公知である。ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素のいくつかのこのようなバリアント（即ち、代表的なヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素ＳＮＰ）を表Ｄ２に示す。

【０３１６】

【表Ｄ２－１】

表D2
ヒトヒスチジルtRNA合成酵素SNP

ジーンバンク(Gene Bank)受託番号	ヌクレオチド変化	ジーンバンク(Gene Bank)受託番号	ヌクレオチド変化
rs193103291	A/G	rs186312047	A/G
rs192923161	C/T	rs186176857	C/T
rs192784934	A/G	rs186043734	C/G
rs192164884	A/G	rs185867584	C/T
rs192090865	A/C	rs185828130	A/G
rs192015101	A/T	rs185537686	A/G
rs191999492	A/G	rs185440931	C/T
rs191852363	C/T	rs185100584	A/C
rs191532032	A/T	rs185077558	C/T
rs191391414	C/T	rs184748736	C/G
rs191385862	A/G	rs184591417	C/T
rs191205977	A/G	rs184400035	C/G
rs191104160	A/G	rs184098206	C/T
rs190989313	C/G	rs183982931	C/T
rs190818970	A/T	rs183942045	A/G
rs190476138	C/T	rs183854085	A/G
rs190289555	C/T	rs183430882	G/T
rs190065567	A/G	rs183419967	A/C
rs189624055	C/T	rs183366286	A/G
rs189563577	G/T	rs183084050	C/T
rs189404434	A/G	rs182948878	C/T
rs189268935	A/G	rs182813126	A/G
rs189103453	A/T	rs182498374	A/G
rs188839103	A/G	rs182161259	A/T
rs188766717	A/G	rs182119902	C/T
rs188705391	A/G	rs182106891	C/T
rs188490030	A/G	rs181930530	A/G
rs188345926	C/T	rs181819577	A/G
rs188174426	A/G	rs181706697	C/T
rs187897435	C/T	rs181400061	G/T
rs187880261	A/G	rs181240610	G/T
rs187729939	G/T	rs181150977	A/C
rs187617985	A/T	rs180848617	A/G
rs187344319	C/T	rs180765564	A/G
rs187136933	C/T	rs151330569	C/G
rs186823043	C/G	rs151258227	C/T
rs186764765	C/T	rs151174822	C/T
rs186663247	A/G	rs150874684	C/T
rs186526524	A/G	rs150589670	A/G
rs150274370	C/T	rs145059663	C/T
rs150090766	A/G	rs144588417	C/T
rs149977222	A/G	rs144457474	A/G
rs149821411	C/T	rs144322728	C/T
rs149542384	A/G	rs143897456	-/C
rs149336018	C/G	rs143569397	G/T
rs149283940	C/T	rs143476664	C/T
rs149259830	C/T	rs143473232	C/G

【表Ｄ２－２】

rs149241235	C/T	rs143436373	G/T
rs149018062	C/T	rs143166254	A/G
rs148935291	C/T	rs143011702	C/G
rs148921342	-/A	rs142994969	A/G
rs148614030	C/T	rs142880704	A/G
rs148584540	C/T	rs142630342	A/G
rs148532075	A/C	rs142522782	-/AAAC
rs148516171	C/T	rs142443502	C/T
rs148394305	-/AA	rs142305093	C/T
rs148267541	C/T	rs142289599	A/G
rs148213958	C/T	rs142088963	A/C
rs147637634	A/G	rs141765732	A/C
rs147372931	A/C/G	rs141386881	A/T
rs147350096	A/C	rs141291994	A/G
rs147288996	C/T	rs141285041	C/T
rs147194882	G/T	rs141220649	C/T
rs147185134	C/T	rs141147961	-/C
rs147172925	A/G	rs141123446	-/A
rs147011612	C/T	rs140516034	A/G
rs147001782	A/G	rs140169815	C/T
rs146922029	C/T	rs140005970	G/T
rs146835587	A/G	rs139699964	C/T
rs146820726	C/T	rs139555499	A/G
rs146801682	C/T	rs139447495	C/T
rs146571500	G/T	rs139364834	-/A
rs146560255	C/T	rs139362540	A/G
rs146205151	-/A	rs139300653	-/A
rs146159952	A/G	rs139251223	A/G
rs145532449	C/G	rs139145072	A/G
rs145446993	A/G	rs138612783	A/G
rs145112012	G/T	rs138582560	A/G
rs138414368	A/G	rs111863295	C/T
rs138377835	A/G	rs111519226	C/G
rs138300828	C/T	rs111314092	C/T
rs138067637	C/T	rs80074170	A/T
rs138035024	A/G	rs79408883	A/C
rs137973748	C/G	rs78741041	G/T
rs137917558	A/G	rs78677246	A/T
rs117912126	A/T	rs78299006	A/G
rs117579809	G/T	rs78085183	A/T
rs116730458	C/T	rs77844754	C/T
rs116411189	A/C	rs77585983	A/T
rs116339664	C/T	rs77576083	A/G
rs116203404	A/T	rs77154058	G/T
rs115091892	G/T	rs76999025	A/G
rs114970855	A/G	rs76496151	C/T
rs114176478	A/G	rs76471225	G/T
rs113992989	C/T	rs76085408	G/T
rs113720830	C/T	rs75409415	A/G
rs113713558	A/C	rs75397255	C/G
rs113627177	G/T	rs74336073	A/G
rs113489608	A/C	rs73791750	C/T
rs113408729	G/T	rs73791749	A/T
rs113255561	A/G	rs73791748	C/T
rs113249111	C/T	rs73791747	A/T
rs113209109	A/G	rs73273304	C/T
rs113066628	G/T	rs73271596	C/T
rs112967222	C/T	rs73271594	C/T

【表Ｄ２－３】

rs112957918	A/T	rs73271591	A/G
rs112859141	A/G	rs73271586	A/T
rs112769834	C/G	rs73271585	A/G
rs112769758	A/C	rs73271584	A/G
rs112701444	A/C	rs73271581	C/T
rs112585944	A/G	rs73271578	A/T
rs112439761	A/G	rs72800925	G/T
rs112427345	A/C	rs72800924	C/T
rs112265354	C/T	rs72800922	A/T
rs112113896	C/G	rs72432753	-/A
rs112033118	C/T	rs72427948	-/A
rs112029988	A/G	rs72388191	-/A
rs72317985	-/A	rs6873628	C/T
rs71583608	G/T	rs5871749	-/C
rs67251579	-/A	rs4334930	A/T
rs67180750	-/A	rs3887397	A/G
rs63429961	A/T	rs3776130	A/C
rs61093427	C/T	rs3776129	C/T
rs61059042	-/A	rs3776128	A/G
rs60936249	-/AA	rs3177856	A/C
rs60916571	-/A	rs2563307	A/G
rs59925457	C/T	rs2563306	A/G
rs59702263	-/A	rs2563305	C/T
rs58302597	C/T	rs2563304	A/G
rs57408905	A/T	rs2530242	C/G
rs35790592	A/C	rs2530241	A/G
rs35609344	-/A	rs2530240	A/G
rs35559471	-/A	rs2530239	A/G
rs35217222	-/C	rs2530235	A/C
rs34903998	-/A	rs2230361	C/T
rs34790864	C/G	rs2073512	C/T
rs34732372	C/T	rs1131046	C/T
rs34291233	-/C	rs1131045	C/G
rs34246519	-/T	rs1131044	C/T
rs34176495	-/C	rs1131043	C/G
rs13359823	A/G	rs1131042	A/C
rs13180544	A/C	rs1131041	C/G
rs12653992	A/C	rs1131040	A/G
rs12652092	A/G	rs1131039	C/T
rs11954514	A/C	rs1131038	A/G
rs11745372	C/T	rs1131037	A/G
rs11548125	A/G	rs1131036	A/G
rs11548124	C/G	rs1131035	C/T
rs11344157	-/C	rs1131034	A/G
rs11336085	-/A	rs1131033	A/G
rs11318345	-/A	rs1131032	A/G
rs11309606	-/A	rs1089305	A/G
rs10713463	-/A	rs1089304	A/C
rs7706544	C/T	rs1065342	A/C
rs7701545	A/T	rs1050252	C/T
rs6880190	C/T	rs1050251	A/T
rs1050250	A/G	rs145769024	-/AAACAAAACAAAACA (**配列番号**154)
rs1050249	C/T	rs10534452	-/AAAAC
rs1050248	A/C/T	rs10534451	-/AAACAAAACA (**配列番号**155)
rs1050247	C/T	rs59554063	-/CAAAACAAAA (**配列番号**156)
rs1050246	C/G	rs58606188	-/CAAAACAAAACAAAA

【表Ｄ２－４】

			(配列番号157)
rs1050245	C/T	rs71835204	(LARGEDELETION)/-
rs1050222	C/T	rs71766955	(LARGEDELETION)/-
rs813897	A/G	rs144998196	-/AAACAAAACA (配列番号158)
rs812381	C/G	rs68038188	-/ACAAAACAAA (配列番号159)
rs811382	C/T	rs71980275	-/AAAAC
rs801189	C/T	rs71848069	-/AAAC
rs801188	A/C	rs60987104	-/AAAC
rs801187	A/T	rs801185	C/T
rs801186	A/G	rs702396	C/G

【０３１７】

さらに、ヒト遺伝子のホモログおよびオルソログは、表Ｄ３に列挙したように、他の種においても存在し、したがって、表Ｄ１、Ｄ４～Ｄ６、またはＤ８に列挙したヒトＨＲＳポリペプチド配列のいずれかの代わりに、ＳＮＰ中に存在する天然に存在するアミノ酸もしくはヌクレオチドバリアント、または他の天然に存在するホモログを選択することは、日常的なことであるはずである。

【０３１８】

【表Ｄ３－１】

表D3 ヒトヒスチジル-tRNA合成酵素のホモログ		
タイプ/ 種 /残基	アミノ酸配列	配列 番号
Mus musculus	MADRAALEELVRLQGAHVRGLKEQKASAEQIEEEVTKLLKLKAQLGQDE GKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMIPDAECLKIMCEILS SLQIGNFLVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQAVEG LGDLKLLFEYLILFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQMPTQAGE EPLGVGSIAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAS EEKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYWEEAGIPLVAIIGEQELRDGVIKLRSVASREEVDVRREDLVEEIRRR TNQPLSTC	18
Canis lupus familiaris	MAERAALEELVRLQGERVRGLKQQKASAEQIEEEVAKLLKLKAQLGPDE GKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIISCFKRHGAEVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMIPDAECLEIMCEILR SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVPDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKN EMVGEKGLAPEVADHIGDYVQQHGGISLVEQLLQDPELSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTLFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPVQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEATE EKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWNAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVASREEVDVPREDLVEEIKRRT SQPFCIC	19
Bos taurus	MADRAALEDLVRVQGERVRGLKQQKASAEQIEEEVAKLLKLKAQLGPDE GKPKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIISCFKRHGAEVIDTPVFELK ETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRY HIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMLPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVPDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKN EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTLFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQPPARAGEEPL GVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEE KVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLISELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEETGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVASREEVDVR REDLVEEIKR RTSQPLCIC	20
Rattus	MADRAALEELVRLQGAHVRGLKEQKASAEQIEEEVTKLLKLKAQLGHDE	21

【表Ｄ３－２】

norvegicus	GKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMIPDAECLKIMCEILS SLQIGNFQVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQAVEG LGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQMPTQAGE EPLGVGSIAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQKLEAS EEKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLISELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGI PLVAIIGEQE LKDGVIKLRSVTSREEVDVR REDLVEEIRR RTSQPLSM	
Gallus gallus	MADEAAVRQQAEVVRRLKQDKAEPDEIAKEVAKLLEMKAHLGGDEGKH KFVLKTPKGTRDYGPKQMAIRERVFSAIIACFKRHGAEVIDTPVFELKETL TGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKITNIKRYHIA KVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMIPDAECLKIVQEILSDLQ LGDFLIKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRTICSSVDKLDKMPWEEVRNEM VGEKGLSPEAADRIGEYVQLHGGMDLIEQLLQDPKLSQNKLVKEGLGDM KLLFEYLTLFGITGKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQQNDHGEESVSV GSVAGGGRYDGLVGMFDPKGR KVPCVGISIGIERIFSILEQRVEASEEKIR TTETQVLVASAQKKLLEERLKLISELWDAGIKAEVLYKKNPKLLNQLQYC EDTGIPLVAIVGEQELKDGVVKLRVVATGEEVNIRRESLVEEIRRRTNQL	22
Danio rerio	MAALGLVSMRLCAGLMGRRSAVRLHSLRVCSGMTISQIDEEVARLLQLK AQLGGDEGKHVFVLKTAKGTRDYNPKQMAIREKVFNIIINCFKRHGAETI DSPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMN KITNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQYDAMIPDAECL KLVYEILSELDLGDFRIKVNDRRILDGMFAICGVPDEKFRTICSTVDKLDKL AWEEVKKEMVNEKGLSEEVADRIRDYVSMQGGKDLAERLLQDPKLSQS KQACAGITDMKLLFSYLELFQITDKVVFDLSLARGLDYYTGVIYEAILTQA NPAPASTPAEQNGAEDAGVSVGSVAGGGRYDGLVGMFDPKAGKCPVWG SALALRGSSPSWSRRQSCLQRRCAPLKLKCLWLQHRRTF	23

【０３１９】

したがって、本発明の方法、診断用組成物、治療用組成物、およびキットのいずれかにおいて、用語「ＨＲＳポリペプチド」、「ＨＲＳタンパク質」、または「ＨＲＳタンパク質断片」は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体に関連した疾患に由来する自己抗体もしくは自己反応性Ｔ細胞と特異的に交差反応し、または非カノニカル活性を持つ少なくとも１種のエピトープを含むヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素のすべての天然に存在する形態および合成形態を含む。このようなＨＲＳポリペプチドは、全長ヒトタンパク質、ならびに表Ｄ１に列挙した全長タンパク質に由来するＨＲＳペプチド、ならびに例えば、表Ｄ２～Ｄ９に開示された、またはこれらから導き出せる天然に存在するバリアントおよび他のバリアントを含む。いくつかの実施形態では、用語ＨＲＳポリペプチドは、長さが約５０～約２５０アミノ酸のヒトヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（表Ｄ１中の配列番号１）に由来するポリペプチド配列を指す。

【０３２０】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、最大約１～５×１０$^{-7}$Ｍ以上の濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいて野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない。したがって、いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、競合性ＥＬＩＳＡで測定した場合、野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（配列番号１）より、疾患関連自己抗体に対する親和性が低い。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、野生型ヒト（配列番号１）に対する疾患関連自己抗体の親和性より、少なくとも約１０分の１低い、または少なくとも約２０分の１低い、または少なくとも約５０分の１低い、または少なくとも約１００分の１低い疾患関連自己抗体に対する見かけ上の親和性を有する。

【０３２１】

修飾されたＨＲＳポリペプチドおよびバリアントＨＲＳポリペプチド

したがって、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素のすべてのこのような相同体、オルソログ

、および天然に存在する、または合成のアイソフォーム（例えば、表Ｄ１～Ｄ９に列挙した、またはこれらから導き出せるタンパク質またはその対応する核酸のいずれか）が、本発明の方法、キット、および組成物のいずれかに含まれる。いくつかの態様では、このようなＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体に関連した疾患を有する被験体に由来する自己抗体もしくは自己反応性Ｔ細胞と特異的に交差反応し、かつ／または非カノニカル活性を持つ少なくとも１種のエピトープを保持する。ＨＲＳポリペプチドは、その天然型で、即ち、ヒトヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の機能的に等価なバリアントとして見ることができる、これらが異なる種において自然において現れるのと異なるバリアントとして存在し得、あるいはこれらは、トランケーション（例えば、Ｎ－末端もしくはＣ－末端または両方からの）、または他のアミノ酸欠失、付加、挿入、置換、もしくは翻訳後修飾によってこれらのアミノ酸配列が異なり得る、これらの機能的に等価な天然誘導体であり得る。例えば、ＨＲＳポリペプチドのピログルタミル、イソアスパルチル、タンパク質分解、リン酸化、グリコシル化、酸化（oxidatized）、異性化、および脱アミノ化バリアントを含めた、任意のＨＲＳポリペプチドの翻訳後修飾および分解産物を含めた天然に存在する化学的誘導体も、本発明の方法および組成物のいずれかに具体的に含まれる。ＨＲＳポリペプチドはまた、本明細書に記載の天然に存在するアミノ酸および／または天然に存在しないアミノ酸から構成され得る。

【０３２２】

天然に存在するアミノ酸のみからなるペプチドに加えて、ペプチド模倣体またはペプチド類似体も提供される。ペプチド類似体は、鋳型ペプチドのものと類似の性質を有する非ペプチド薬として製薬業界で一般に使用される。これらのタイプの非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体（peptide mimetic）」または「ペプチド模倣体（peptidomimetic）」と呼ばれる（Luthmanら、A Textbook of Drug Design and Development、１４巻：３８６～４０６頁、２版、Harwood Academic Publishers（１９９６年）；Joachim Grante、Angew. Chem. Int. Ed. Engl.、３３巻：１６９９～１７２０頁（１９９４年）；Fauchere, J.、Adv. Drug Res.、１５巻：２９頁（１９８６年）；VeberおよびFreidinger、ＴＩＮＳ、３９２頁（１９８５年）；ならびにEvansら、J. Med. Chem.、３０巻：２２９頁（１９８７年））。ペプチド模倣体は、ペプチドの生物活性を模倣するが、化学的特質においてもはやペプチド性ではない分子である。ペプチド模倣化合物は、当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第６，２４５，８８６号に記載されている。ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、例えば、ｉｎ ｖｉｖｏでタンパク質分解に対する耐性を増大させるために、Ｄ－アミノ酸から部分的または完全に構成することができる（例えば、Wadeら、PNAS USA.、８７巻：４７６１～４７６５頁、１９９０年；Hayryら、FASEB Journal.、９巻：１３３６～４４頁、１９９５年；Van RegenmortelおよびMuller、Curr. Opin. Biotechol.、９巻：３７７～８２頁、１９９８年；Navabら、Circulation.、１０５巻：２９０～２９２頁、２００２年；Tugyiら、PNAS USA.、１０２巻：４１２～４１８頁、２００５年；ならびに米国出願２００４／０００８６９８８号を参照；レトロ－インベルソ－Ｄ－ペプチドについて、Ｔａｙｌｏｒら、Biochemistry.、４９巻：３２６１～７２頁、２０１０年も参照；Ｄ－アミノ酸が増加した組換えタンパク質を産生することができる改変された細菌リボソームについて、Dedkovaら、Biochemistry.、４５巻：１５５４１～５１頁、２００６年も参照）。

【０３２３】

タンパク質またはペプチドの有用な活性を保持しながら、これらの配列を合成的に修飾することは当技術分野で公知であり、これは、当技術分野で標準的であり、文献に広く記載されている技法、例えば、核酸のランダムもしくは部位特異的な変異誘発、切断、およびライゲーションを使用して、またはアミノ酸もしくはポリペプチド鎖の化学合成もしくは修飾を介して実現することができる。同様に、免疫原性の懸念がＨＲＳポリペプチドまたはそのバリアントを使用して生じる場合、例えば、潜在的なＴ細胞エピトープを同定するための自動コンピュータ認識プログラム、および免疫原性のより低い形態を同定するための指向進化手法を使用することによって、これらの免疫原性の懸念に対処し、かつ／ま

たはこれらを緩和することは、当技術分野の技術の範囲内である。

【０３２４】

上述したように、本発明の実施形態は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素のすべての相同体、オルソログ、および天然に存在するアイソフォーム（例えば、表Ｄ１～Ｄ９に列挙した、もしくはこれらから導き出せるタンパク質またはその対応する核酸のいずれか）、ならびにこれらのＨＲＳ参照ポリペプチドの「バリアント」を含む。ポリペプチド「バリアント」という記述は、少なくとも１つのアミノ酸残基の付加、欠失、および／または置換によって参照ＨＲＳポリペプチドと区別され、一般に、参照ＨＲＳポリペプチドの１種または複数種の非カノニカル活性を保持し（例えば、模倣し）、または調節する（例えば、アンタゴナイズする）ポリペプチドを指す。バリアントは、改善された安定性または他の薬学的性質を有するように、少なくとも１つのアミノ酸残基の付加、欠失、および／または置換によって修飾されたポリペプチドも含む。

【０３２５】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドバリアントは、本明細書に記載の、かつ当技術分野で公知の、保存的であっても非保存的であってもよい１つまたは複数の置換によって参照ポリペプチドと区別される。ある特定の実施形態では、ポリペプチドバリアントは、同類置換を含み、この点において、ポリペプチドの活性の特質を変更することなく、いくつかのアミノ酸を広く同様の性質を有する他のアミノ酸に変更することができることが、当技術分野で十分に理解されている。

【０３２６】

本発明の方法および組成物のいずれかにおいて有用なＨＲＳポリペプチドバリアントの具体例としては、ｉ）検出可能な非カノニカル活性を保持し、かつ／またはヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体に関連した疾患を有する被験体に由来する自己抗体もしくは自己反応性Ｔ細胞と特異的に交差反応する少なくとも１種のエピトープを保持し、ｉｉ）１つまたは複数の追加のアミノ酸挿入、置換、欠失、および／またはトランケーションを有する、全長ＨＲＳポリペプチド、またはこれらのトランケーション体もしくはスプライスバリアント（例えば、表Ｄ１～Ｄ９に列挙した、またはこれらから導き出せるタンパク質のいずれか）がある。ある特定の実施形態では、バリアントポリペプチドは、本明細書に記載のＨＲＳ参照ポリペプチド（例えば、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２、または表Ｄ１～Ｄ９に列挙した、もしくはこれらから導き出せるタンパク質のいずれか）の対応する配列と少なくとも約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、またはそれ以上の配列同一性または類似性を有するアミノ酸配列を含み、その参照ポリペプチドの非カノニカル活性を実質的に保持する。１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、またはそれ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換によって参照ＨＲＳ配列と異なるが、参照ＨＲＳポリペプチドの性質を保持する配列も含まれる。ある特定の実施形態では、アミノ酸付加または欠失は、ＨＲＳ参照ポリペプチドのＣ－末端および／またはＮ－末端で行われる。ある特定の実施形態では、アミノ酸付加は、ＨＲＳ参照ポリペプチドのＣ－末端および／またはＮ－末端の近位である１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、またはそれ以上の野生型残基（即ち、対応する全長のＨＲＳポリペプチドから）を含む。

【０３２７】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２の１つもしくは複数に示したＨＲＳポリペプチド配列、または表Ｄ１～Ｄ９に列挙した、もしくはこれらから導き出せるタンパク質のいずれかのアミノ酸を含み、これらからなり、またはこれらから本質的になる約５０～２５０アミノ酸の全長ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素のポリ

ペプチド断片を含む。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１の残基１～１４１、１～４０８、１～１１３、または１～６０を含み、これらからなり、またはこれらから本質的になる。いくつかの態様では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１の残基１～６０＋１７５～５０９、１～６０＋２１１～５０９、または１～６０＋１０１～５０９を含み、これらからなり、またはこれらから本質的になるスプライスバリアントである。特定の態様では、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１の残基１～４８または１～５０６を含み、これらからなり、またはこれらから本質的になる。

【０３２８】

ある特定の実施形態では、本発明のＨＲＳポリペプチドは、ｉｎ　ｖｉｖｏで抗炎症活性を調節し、または抗体もしくは自己反応性Ｔ細胞遮断活性を有することができる全長ＨＲＳポリペプチドの最小活性断片を含む。いくつかの態様では、このような最小活性断片は、ＷＨＥＰドメイン（即ち、配列番号１のアミノ酸約１～４３）を含むかまたはこれらから本質的になる。いくつかの態様では、最小活性断片は、アミノアシル化ドメイン（即ち、配列番号１のアミノ酸約５４～３９８）を含むかまたはこれらから本質的になる。いくつかの態様では、最小活性断片は、アンチコドン結合ドメイン（即ち、配列番号１のアミノ酸約４０６～５０１）を含むかまたはこれらから本質的になる。他の例示的な活性断片を以下の表Ｄ４に示す。

【０３２９】

【表Ｄ４－１】

表D4

例示的なHRSポリペプチド断片

名称	配列番号1のアミノ酸残基範囲	アミノ酸配列	配列番号
HRS(1-500)	タンパク質/ヒト/1-500	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKR	160

【表Ｄ４－２】

HRS(1-501)	タンパク質/ヒト/1-501	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRR	161
HRS(1-502)	タンパク質/ヒト/1-502	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRT	162
HRS(1-503)	タンパク質/ヒト/1-503	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTG	163
HRS(1-504)	タンパク質/ヒト/1-504	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQ	164
HRS(1-505)	タンパク質/ヒト/1-505	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD	165

【表Ｄ４－３】

		YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQP	
HisRS1^{N8} HRS(1-506)	タンパク質/ヒト/ 1-506	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPL	70
HRS(2-506)	タンパク質/ヒト/ 2-506	AERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRC FKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGEL LSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMT RGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDF LVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEE VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK LSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDY YTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMF DPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLV ASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQ YCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLV EEIKRRTGQPL	166
HRS(1-507)	タンパク質/ヒト/ 1-507	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLC	167
HRS(1-508)	タンパク質/ヒト/ 1-508	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLCI	168

【表Ｄ４－４】

HRS(1-509)	タンパク質/ヒト/1-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVII RCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLCIC	169
$HisRS1^{N6}$ HRS(1-48)	タンパク質/ヒト/1-48	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPD	71

【０３３０】

ある特定の実施形態では、このような最小活性断片は、最小限ドメインを異種タンパク質またはスプライスバリアントに接続する可動性リンカーの１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８の、または２９すべてのアミノ酸を含み得る。

【０３３１】

いずれの１つの理論にも束縛されることを望むことなく、ある特定のＨＲＳポリペプチド中のＷＨＥＰドメインのユニークな配向またはコンホメーションは、これらのタンパク質で観察される非カノニカル活性および／または抗体遮断活性の増強に寄与し得る。

【０３３２】

「配列同一性」または例えば、「～と５０％同一の配列」を含むことという記述は、本明細書において、配列が、比較のウインドウにわたってヌクレオチド対ヌクレオチドベースまたはアミノ酸対アミノ酸ベースで同一である程度を指す。したがって、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較のウインドウにわたって２つの最適に整列された配列を比較し、同一の核酸塩基（例えば、Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、Ｉ）、または同一のアミノ酸残基（例えば、Ａｌａ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｙ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、およびＭｅｔ）が両配列内で起こる位置の数を求めてマッチした位置の数を得、マッチした位置の数を比較のウインドウ内の位置の総数（即ち、ウインドウサイズ）で除し、結果に１００を乗じて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算することができる。

【０３３３】

２つ以上のポリペプチド間の配列関係を記述するのに使用される用語には、「参照配列」、「比較ウインドウ」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセンテージ」、および「実質的な同一性」がある。「参照配列」は、長さが少なくとも１２、しかししばしば１５～１８、多くの場合少なくとも２５の、ヌクレオチドおよびアミノ酸残基を含めたモノマー単位である。２つのポリペプチドはそれぞれ、（１）２つのポリペプチド間で同様である配列（即ち、完全なポリペプチド配列の一部のみ、および（２）２つのポリペプチド間で多岐にわたる配列を含み得るので、２つ（またはそれ以上）のポリペプチド間の配列比較は一般に、「比較ウインドウ」にわたって２つのポリペプチドの配列を比較して、配列類似性の局所領域を同定および比較することによって実施される。「比較ウインドウ」は、少なくとも６つの連続した位置、通常約５０～約１００、より通常には約１００～約１５０の概念上のセグメントを指し、この中で一配列が、同じ数の連続した位置の参照配列と、２つの配列が最適に整列された後に比較される。比較ウインドウは、２つの配列の最適な整列に関して、参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して、約２０％以下の

付加または欠失（即ち、ギャップ）を含み得る。比較ウインドウを整列するための配列の最適な整列は、アルゴリズム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｐａｃｋａｇｅ Ｒｅｌｅａｓｅ ７．０、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ、ＵＳＡ中のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、およびＴＦＡＳＴＡ）のコンピュータ化実行によって、または検査、ならびに選択された様々な方法のいずれかにより生成される最良整列（即ち、比較ウインドウにわたって最高パーセンテージの相同性をもたらす）によって行うことができる。参照はまた、例えば、Altschulら、１９９７年、Nucl. Acids Res.、２５巻：３３８９頁によって開示されたプログラムのＢＬＡＳＴファミリーに対して行うことができる。配列分析の詳細な考察は、Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley & Sons Inc、１９９４～１９９８年、１５章のユニット１９．３に見出すことができる。

【０３３４】

配列同士間の配列類似性または配列同一性（用語は、本明細書で互換的に使用される）の計算は、以下のように実施することができる。２つのアミノ酸配列または２つの核酸配列のパーセント同一性を求めるために、配列を最適な比較目的で整列させることができる（例えば、最適な整列のために、第１および第２のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、異種配列を比較目的で無視することができる）。ある特定の実施形態では、比較目的で整列される参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも３０％、好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは、少なくとも５０％、６０％、さらにより好ましくは、少なくとも７０％、８０％、９０％、１００％である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第１の配列中の位置が、第２の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有される場合、分子は、その位置において同一である。

【０３３５】

２つの配列間のパーセント同一性は、２つの配列の最適な整列のために導入される必要がある、ギャップの数および各ギャップの長さを考慮して、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

【０３３６】

２つの配列間の配列の比較およびパーセント同一性の決定は、数学アルゴリズムを使用して達成することができる。いくつかの実施形態では、２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ＧＣＧソフトウェアパッケージ中のＧＡＰプログラム中に組み込まれたNeedlemanおよびWunsch（１９７０年、J. Mol. Biol.、４８巻：４４４～４５３頁）のアルゴリズムを使用して、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックスのいずれか、および１６、１４、１２、１０、８、６、または４のギャップ重み、および１、２、３、４、５、または６の長さ重みを使用して判定される。さらに別の好適な実施形態では、２つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ＧＣＧソフトウェアパッケージ中のＧＡＰプログラムを使用して、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰマトリックス、および４０、５０、６０、７０、または８０のギャップ重み、および１、２、３、４、５、または６の長さ重みを使用して判定される。別の例示的なパラメータのセットには、１２のギャップペナルティー、４のギャップ伸長ペナルティー、および５のフレームシフトギャップペナルティーを有するＢｌｏｓｓｕｍ６２スコアリングマトリックスが含まれる。２つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）中に組み込まれたE. MeyersおよびW. Miller（１９８９年、Cabios、４巻：１１～１７頁）のアルゴリズムを使用して、ＰＡＭ１２０重み残基表、１２のギャップ長ペナルティー、および４のギャップペナルティーを使用しても判定することができる。

【０３３７】

本明細書に記載の核酸およびタンパク質配列を、公共データベースに対して探索を実施

するための「クエリー配列」として使用して、例えば、他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定することができる。このような探索は、Altschulら、（１９９０年、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ、２１５巻：４０３～１０頁）のＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラム（バージョン２．０）を使用して実施することができる。ＢＬＡＳＴヌクレオチド探索を、ＮＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝１００、ワード長＝１２を用いて実施して、本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得ることができる。ＢＬＡＳＴタンパク質探索を、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３を用いて実施して、本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップのある整列を得るために、Altschulら（Nucleic Acids Res.、２５巻：３３８９～３４０２頁、１９９７年）に記載のギャップドＢＬＡＳＴを利用することができる。ＢＬＡＳＴおよびギャップドＢＬＡＳＴプログラムを利用するとき、それぞれのプログラムのデフォルトのパラメータ（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）を使用することができる。

【０３３８】

ある特定の実施形態では、バリアントポリペプチドは、残基の少なくとも１％であるが、２０％、１５％、１０％、または５％未満、対応するＨＲＳ参照配列と異なる。この比較が整列を必要とする場合、配列は、最大類似性について整列されるべきである。欠失もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列が差異と見なされる。差異は、適切には、非必須残基における差異もしくは変化、または同類置換である。ある特定の実施形態では、バリアントＨＲＳポリペプチドの分子量は、ＨＲＳ参照ポリペプチドの分子量と約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、またはそれ以上異なる。

【０３３９】

ＨＲＳ参照ポリペプチドの生物学的活性「断片」、即ち、ＨＲＳタンパク質断片の生物学的活性断片も含まれる。代表的な生物学的活性断片は、一般に、相互作用、例えば、分子内または分子間相互作用に参加する。分子間相互作用は、特異的結合相互作用または酵素的相互作用であり得る。分子間相互作用は、ＨＲＳポリペプチドと、ＨＲＳポリペプチドの非カノニカル活性に参加する細胞結合パートナー、例えば、細胞受容体または他のホスト分子などとの間であり得る。

【０３４０】

ＨＲＳ参照ポリペプチドの生物学的活性断片は、例えば、本明細書に記載のＨＲＳ参照ポリペプチドのいずれか１つに示されたアミノ酸配列の、例えば、間のすべての整数（例えば、１０１、１０２、１０３）および範囲（例えば、５０～１００、５０～１５０、５０～２００）を含む、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２４０、２６０、２８０、３００、３２０、３２１、３２２、３２３、３２４、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３１、３３２、３３３、３３４、３３５、３３６、３３７、３３８、３３９、３４０、３４１、３４２、３４３、３４４、３４５、３４６、３４７、３４８、３４９、３５０、３５１、３５２、３５３、３５４、３５５、３５６、３５７、３８、３５９、３６０、３６１、３６２、３６３、３６４、３６５、３８０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、４９６、４９７、４９８、４９９、５００、５０１、５０２、５０３、５０４、５０５、５０６、５０７、５０８またはそれ以上の連続したまたは連続していないアミノ酸であるポリペプチド断片であり得る。ある特定の実施形態では、生物学的活性断片は、非カノニカル活性関連配列、ドメイン、またはモチーフを含む。ある特定の実施形態では、任意のＨＲＳ参照ポリペプチドのＣ－末端またはＮ－末端領域は、トランケートされたＨＲＳポリペプチドが参照ポリペプチドの非カノニカル活性を保持する限り、間のすべての整数および範囲（例えば、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５）を含む、約１、２

、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、もしくはそれ以上のアミノ酸、または約１０～５０、２０～５０、５０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～２５０、２５０～３００、３００～３５０、３５０～４００、４００～４５０、４５０～５００もしくはそれ以上のアミノ酸によってトランケートされている場合がある。ある特定の例示的なトランケートされたＨＲＳポリペプチドを以下の表Ｄ５に示す。

【０３４１】

【表Ｄ５－１】

表D5
例示的なトランケートされたHRSポリペプチド

C末端トランケーション		
HRS範囲	**配列**	**配列番号**
1-80	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	74
1-79	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDV	75
1-78	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFD	76
1-77	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVF	77
1-76	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKV	78
1-75	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREK	79
1-74	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVRE	80
1-73	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVR	81
1-72	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAV	82
1-71	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMA	83
1-70	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQM	84
1-69	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQ	85
1-68	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPR	86
1-67	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSP	87
1-66	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS	88
1-65	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDY	89
1-64	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRD	90
1-63	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTR	91

【表Ｄ５－２】

1-62	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGT	92
1-61	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKG	93
1-60	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPK	94
1-59	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTP	95
1-58	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKT	96
1-57	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLK	97
1-56	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVL	98
1-55	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFV	99
1-54	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKF	100
1-53	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQK	101
1-52	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQ	102
1-51	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESK	103
1-50	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDES	104
1-49	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDE	105
1-48	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPD	106
1-47	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGP	107
1-46	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLG	108
1-45	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQL	109
1-44	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQ	110
1-43	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKA	111
1-42	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LK	112
1-41	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK L	113
1-40	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK	114
N末端トランケーション		
2-80	AERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	115
3-80	ERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	116
4-80	RAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	117
5-80	AALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	118
6-80	ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	119
7-80	LEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	120
8-80	EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	121
9-80	ELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	122
10-80	LVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK	123

【表Ｄ５－３】

	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	
11-80	VKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	124
12-80	KLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	125
13-80	LQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	126
14-80	QGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	127
15-80	GERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	128
16-80	RVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	129
17-80	VRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	130
18-80	RGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	131
19-80	GLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	132
20-80	LKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	133
21-80	KQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	134
22-80	QQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	135
23-80	QKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	136
24-80	KASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	137
25-80	ASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	138
26-80	SAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	139
27-80	AELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	140
28-80	ELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	141
29-80	LIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	142
30-80	IEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	143
31-80	EEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	144
32-80	EEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	145
33-80	EVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	146
34-80	VAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	147
35-80	AKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	148
36-80	KLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	149
37-80	LLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	150
38-80	LK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	151
39-80	K LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	152
40-80	LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVI	153

【０３４２】

一般に、生物学的活性断片は、これが由来する生物学的活性（即ち、非カノニカル活性）ＨＲＳ参照ポリペプチドの活性の約１％、１０％、２５％、または５０％以上を有する。このような非カノニカル活性を測定するための例示的な方法を実施例に記載する。

【０３４３】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳタンパク質、バリアント、およびこれらの生物学的活

性断片は、少なくとも約０．０１、０．０５、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、４０、５０、１００、または１５０ｎＭの親和性で、１種または複数種の細胞結合パートナーに結合する。いくつかの実施形態では、選択された細胞結合パートナー、特に、非カノニカル活性に参加する結合パートナーに対するＨＲＳタンパク質断片の結合親和性は、対応する全長ＨＲＳポリペプチドまたは特定の代わりにスプライスされたＨＲＳポリペプチドバリアントの結合親和性より、少なくとも約１．５倍、２倍、２．５倍、３倍、３．５倍、４倍、４．５倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、６００倍、７００倍、８００倍、９００倍、１０００倍、またはそれ以上（間のすべての整数を含む）強い場合がある。

【０３４４】

上述したように、ＨＲＳポリペプチドは、アミノ酸置換、欠失、トランケーション、および挿入を含めた様々な方法で変更することができる。このような操作の方法は、当技術分野で一般に公知である。例えば、ＨＲＳ参照ポリペプチドのアミノ酸配列変異体は、ＤＮＡ中の変異によって調製することができる。変異誘発およびヌクレオチド配列変更のための方法は、当技術分野で周知である。例えば、Kunkel（１９８５年、PNAS USA.、８２巻：４８８～４９２頁）、Kunkelら（１９８７年、Methods in Enzymol、１５４巻：３６７～３８２頁）、米国特許第４，８７３，１９２号、Watson,J. D.ら（「Molecular Biology of the Gene」、４版、Benjamin/Cummings、Menlo Park、Calif.、１９８７年）、およびこれらで引用された参考文献を参照。目的のタンパク質の生物活性に影響しない適切なアミノ酸置換に関するガイダンスは、Dayhoffら、（１９７８年）Atlas of Protein Sequence and Structure（Natl. Biomed. Res. Found.、Washington, D. C.）のモデルに見つけることができる。

【０３４５】

生物学的に活性なトランケートされたＨＲＳポリペプチドおよび／またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、参照ＨＲＳアミノ酸残基と比較して、これらの配列に沿った様々な位置で保存的アミノ酸置換を含有することができ、このような追加の置換は、システイン含量が変化したＨＲＳポリペプチドの活性または安定性をさらに増強することができる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基と置き換えられているものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されており、これらは一般に、以下のように下位分類することができる。

【０３４６】

酸性：ペプチドが生理的ｐＨの水媒体中にあるとき、残基は、生理的ｐＨでＨイオンを喪失するために負電荷を有し、これが含有されているペプチドのコンホメーション中の表面位置を求めるように水溶液によって引き寄せられる。酸性側鎖を有するアミノ酸としては、グルタミン酸およびアスパラギン酸がある。

【０３４７】

塩基性：ペプチドが生理的ｐＨの水媒体中にあるとき、残基は、生理的ｐＨまたはその１または２ｐＨ単位内でＨイオンと会合するために正電荷を有し（例えば、ヒスチジン）、これが含有されているペプチドのコンホメーション中の表面位置を求めるように水溶液によって引き寄せられる。塩基性側鎖を有するアミノ酸としては、アルギニン、リシン、およびヒスチジンがある。

【０３４８】

荷電：残基は、生理的ｐＨで荷電しており、したがって、酸性または塩基性側鎖を有するアミノ酸を含む（即ち、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、リシン、およびヒスチジン）。

【０３４９】

疎水性：ペプチドが水媒体中にあるとき、残基は、生理的ｐＨで荷電しておらず、これが含有されているペプチドのコンホメーション中の内側の位置を求めるように水溶液によって反発される。疎水性側鎖を有するアミノ酸としては、チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、およびトリプトファンがある。

【０３５０】

中性／極性：ペプチドが水媒体中にあるとき、残基は、生理的ｐＨで荷電していないが、水溶液によって十分に反発されておらず、その結果、これが含有されているペプチドのコンホメーション中の内側の位置を求めるはずである。中性／極性側鎖を有するアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、システイン、ヒスチジン、セリン、およびトレオニンがある。

【０３５１】

この説明はまた、ある特定のアミノ酸を「小さい」と特徴付け、その理由は、これらの側鎖が、極性基を欠いていても、疎水性を付与するほど十分に大きくないためである。プロリンを例外として、「小さい」アミノ酸は、少なくとも１つの極性基が側鎖上にあるとき４個以下の炭素を有し、極性基が側鎖上にないとき３個以下の炭素を有するものである。小さい側鎖を有するアミノ酸としては、グリシン、セリン、アラニン、およびトレオニンがある。遺伝子でコードされる２級アミノ酸プロリンは、ペプチド鎖の二次コンホメーションに対するその公知の効果に起因して特別なケースである。プロリンの構造は、その側鎖がα－アミノ基の窒素、およびα－炭素に結合している点ですべての他の天然に存在するアミノ酸と異なる。いくつかのアミノ酸類似性マトリックスが当技術分野で公知である（例えば、Dayhoffら、１９７８年、A model of evolutionary change in proteinsによって開示されたＰＡＭ１２０マトリックスおよびＰＡＭ２５０マトリックスを参照）。しかし、M. O. Dayhoff（編）、Atlas of protein sequence and structure、５巻、３４５～３５８頁、National Biomedical Research Foundation、Washington DCにおける、およびGonnetら（Science、２５６巻：１４４３０～１４４４５頁、１９９２年）による距離関係を求めるためのマトリックスは、グリシン、セリン、アラニン、およびトレオニンと同じ群内にプロリンを含む。したがって、本発明の目的に関して、プロリンは、「小さい」アミノ酸として分類される。

【０３５２】

極性または非極性として分類するのに要求される引力または反発の程度は任意であり、したがって、本発明によって具体的に企図されているアミノ酸は、どちらか一方として分類されている。具体的に名付けられていないほとんどのアミノ酸は、公知の挙動に基づいて分類することができる。

【０３５３】

アミノ酸残基は、環式または非環式、および芳香族または非芳香族、残基の側鎖置換基に関して自明の分類、および小さいまたは大きいとしてさらに下位分類することができる。残基は、これが、追加の極性置換基が存在するという条件で、カルボキシル炭素を含めて合計４個以下の炭素原子、追加の極性置換基が存在しないという条件で、３個以下の炭素原子を含有する場合、小さいと見なされる。小さい残基はもちろん、常に非芳香族である。これらの構造的性質に応じて、アミノ酸残基は、２つ以上のクラス内に入る場合がある。天然に存在するタンパク質アミノ酸について、このスキームに従う下位分類を表Ａに提示する。

【０３５４】

【表Ａ】

表 A: アミノ酸の下位分類

サブクラス	アミノ酸
酸性	アスパラギン酸、グルタミン酸
塩基性	非環式:アルギニン、リシン;環式:ヒスチジン
荷電	アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リシン、ヒスチジン
小さい	グリシン、セリン、アラニン、トレオニン、プロリン
極性/中性	アスパラギン、ヒスチジン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン
極性/大きい	アスパラギン、グルタミン
疎水性	チロシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン
芳香族	トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン
鎖の配向に影響を与える残基	グリシンおよびプロリン

【０３５５】

保存的アミノ酸置換は、側鎖に基づくグループ分けも含む。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり、脂肪族－ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリンおよびトレオニンであり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギンおよびグルタミンであり、芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり、塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リシン、アルギニン、およびヒスチジンであり、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システインおよびメチオニンである。例えば、ロイシンのイソロイシンもしくはバリンとの置き換え、アスパラギン酸のグルタミン酸との置き換え、トレオニンのセリンとの置き換え、または一アミノ酸の構造的に関連したアミノ酸との同様の置き換えは、得られるバリアントポリペプチドの性質に主要な効果を有さないと予期することは合理的である。アミノ酸変化が機能的な、トランケートされたＨＲＳポリペプチド／またはバリアントＨＲＳポリペプチドをもたらすか否かは、本明細書に記載されるように、その非カノニカル活性をアッセイすることによって容易に判定することができる。同類置換を、例示的な置換という表題の下で表Ｂに示す。本発明の範囲内に入るアミノ酸置換は、一般に、（ａ）置換の範囲内のペプチド骨格の構造、（ｂ）標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、（ｃ）側鎖の嵩、または（ｄ）生物学的機能を維持することに対して、これらの効果が著しく異ならない置換を選択することによって達成される。置換が導入された後、バリアントは、生物活性についてスクリーニングされる。

【０３５６】

【表Ｂ】

表B: 例示的なアミノ酸置換

元の残基	例示的な置換	好適な置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala, Leu, Val	Ser, Ala
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

【０３５７】

代わりに、同類置換を行うための同様のアミノ酸を、側鎖の同一性に基づいて３つのカテゴリーにグループ分けすることができる。Zubay, G.、Biochemistry、３版、Wm.C. Brown Publishers（１９９３年）に記載されているように、第１の群は、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、リシン、ヒスチジンを含み、これらはすべて荷電側鎖を有し、第２の群は、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、グルタミン、アスパラギンを含み、第３の群は、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンを含む。

【０３５８】

ヒトＨＲＳ ＷＨＥＰドメインのＮＭＲ構造が求められた（Namekiら、Accession 1X59_Aを参照）。さらに、全長ヒトＨＲＳ、およびＨＲＳの内部触媒ドメイン欠失変異体（ＨＲＳΔＣＤ）の結晶構造も求められた（Xuら、Structure.、２０巻：１４７０～７頁、２０１２年、および米国出願第６１／６７４，６３９号を参照）。ＨＲＳの主要なアミノ酸配列と併せて、タンパク質のこれらの詳細な物理的説明は、タンパク質内の特定のアミノ酸が果たす役割への正確な洞察をもたらす。したがって当業者は、他の構造的特徴の中でも構造的に保存されたドメイン、連結領域、アルファーヘリックスなどの二次構造、表面または溶媒に曝露したアミノ酸、曝露されていない、または内部の領域、触媒部位、およびリガンド相互作用表面を同定するのにこの情報を使用することができる。次いでこのような人は、その情報および他の情報を使用して、例えば、これらおよび他の構造的特徴

内の、またはそれに隣接するアミノ酸残基の特性を保存または変更することによって、例えば、野生型残基と比べて、選択されたアミノ酸側鎖（複数可）の極性、疎水性親水性指数、電荷、サイズ、および／またはポジショニング（即ち、内向き、外向き）を保存または変更することなどによって、目的の非カノニカル活性を保持または改善するＨＲＳバリアントを容易に操作することができる（例えば、Zaiwaraら、Mol Biotechnol.、５１巻：６７～１０２頁、２０１２年；PeronaおよびHadd、Biochemistry.、５１巻：８７０５～２９頁、２０１２年；Morinら、Trends Biotechol.、２９巻：１５９～６６頁、２０１１年；Collinsら、Annu. Rev. Biophys.、４０巻：８１～９８頁、２０１１年；ならびに米国出願第６１／６７４，６３９号を参照）。

【０３５９】

したがって、トランケートされたＨＲＳポリペプチドおよび／またはバリアントＨＲＳポリペプチド中の予測される非必須アミノ酸残基は一般に、同じ側鎖ファミリーに由来する別のアミノ酸残基と置き換えられる。代わりに、飽和変異誘発などによって、ＨＲＳコード配列のすべてまたは一部に沿って変異をランダムに導入することができ、結果として生じる変異体を親ポリペプチドの活性についてスクリーニングして、その活性を保持する変異体を同定することができる。コード配列の変異誘発の後に、コードされるペプチドを組換えで発現させることができ、ペプチドの活性を判定することができる。「非必須」アミノ酸残基は、一実施形態のポリペプチドの参照配列から、その非カノニカル活性の１つまたは複数を無効にすることなく、または実質的に変更することなく変更され得る残基である。適切には、変更によりこれらの活性の１つは実質的に無効にされず、例えば、活性は、参照ＨＲＳ配列の少なくとも２０％、４０％、６０％、７０％または８０％、１００％、５００％、１０００％、またはそれ以上である。「必須」アミノ酸残基は、ＨＲＳポリペプチドの参照配列から変更されるとき、親分子の活性の無効をもたらし、その結果、参照活性の２０％未満が存在する残基である。例えば、このような必須アミノ酸残基には、様々な源に由来するＨＲＳポリペプチドの活性結合部位（複数可）またはモチーフ（複数可）中に保存されている配列を含めて、異なる種にわたってＨＲＳポリペプチド中に保存されているものが含まれる。

【０３６０】

ｉｎ ｖｉｔｒｏ細胞からのサイトカイン放出の慣例的な測定に基づくものを含めた、抗炎症活性を判定するためのアッセイ、および動物試験は、当技術分野で十分に確立されており（例えば、Wittmannら、J Vis Exp.（６５号）：ｅ４２０３頁. doi:10.3791/4203、２０１２年；Feldmanら、Mol Cell.、４７巻：５８５～９５頁、２０１２年；Clutterbuckら、J Proteomics.、７４巻：７０４～１５頁、２０１１年、GiddingsおよびMaitra、J Biomol Screen.、１５巻：１２０４～１０頁、２０１０年；Wijnhovenら、Glycoconj J.、２５巻：１７７～８５頁、２００８年；ならびにFrowら、Med Res Rev.、２４巻：２７６～９８頁、２００４年を参照）、抗炎症活性をプロファイリングおよび最適化するのに容易に使用することができる。少なくとも１つの例示的なｉｎ ｖｉｖｏ実験システムが、付随した実施例に記載されている。

【０３６１】

ある特定のＨＲＳポリペプチドは、１つまたは複数のシステイン置換を有する場合があり、この場合、１つまたは複数の天然に存在する（非システイン）残基が、例えば、安定性またはｐＫ特性を変更する、ＰＥＧ分子のチオールに基づく付着を促進するなどのために、システインと置換されている。いくつかの実施形態では、システイン置換は、ＨＲＳポリペプチド（例えば、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２）のＮ－末端および／もしくはＣ－末端付近、またはＨＲＳポリペプチドの他の表面曝露領域である。特定の実施形態は、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、または１７６～１８２のいずれか１つのＮ－末端および／またはＣ－末端と比べて、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５アミノ酸以内の残基の１つまたは複数

がシステイン残基と置換されている場合を含む。いくつかの実施形態では、システイン残基を、ＮまたはＣ－末端融合タンパク質の創製によってＨＲＳポリペプチドに付加することができる。このような融合タンパク質は、任意の長さのものであり得るが、一般に、長さが約１～５、または約５～１０、約１０～２０、または約２０～３０アミノ酸となる。いくつかの実施形態では、Ｃ－末端への融合が好適である。

【０３６２】

このようなシステイン修飾タンパク質の具体的な例示的実施形態を、ＨＲＳポリペプチドＨＲＳ（１～６０）に基づいて表Ｄ６に示す。この手法は、表Ｄ５のＨＲＳポリペプチド、および本明細書に記載の他のＨＲＳポリペプチドに直接適用可能である。

【０３６３】

【表Ｄ６】

表D6

名称	タンパク質配列	配列番号
HRS(1-60)-M1MC-	MCAERAALEE LVKLQGERVR GLKQQKASAE LIEEEVAKLL KLKAQLGPDE SKQKFVLKTP K	170
HRS(1-60)-A26C-	MAERAALEEL VKLQGERVRG LKQQKCSAEL IEEEVAKLLK LKAQLGPDES KQKFVLKTPK	171
HRS(1-60)-C61	MAERAALEEL VKLQGERVRG LKQQKASAEL IEEEVAKLLK LKAQLGPDES KQKFVLKTPK C	172
DNA配列		
HRS(1-60)-M1MC-	ATGTGTGCAGAAAGAGCCGCCCTGGAAGAGTTAGTTAAGTTGCAAGGTG AACGTGTCCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGA AGAAGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCGGAC GAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCCGAAA	173
HRS(1-60)-A26C-	ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGAAC GTGTTCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGTGCAGCGCGGAGCTGATCGAAGA AGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCGGACGAG AGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCCGAAA	174
HRS(1-60)-C61	ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGAAC GTGTTCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGA AGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCGGACGAG AGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCCGAAATGC	175

【０３６４】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチド中へのシステイン残基（複数可）の挿入または置換は、他の表面に曝露したシステイン残基の排除と組み合わせることができる。したがって、いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、例えば、天然に存在するシステイン残基を除去するためのＣｙｓ８３、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ１９６、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ３７９、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、および／またはＣｙｓ５０９（配列番号１によって定義した場合）における１つまたは複数の置換および／または欠失を含み得る。

【０３６５】

特定の実施形態は、例えば、Ｃ－末端の３アミノ酸の欠失（Δ５０７～５０９）による、Ｃｙｓ８３、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ１９６、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ３７９、Ｃｙｓ４５５の任意の１つまたは複数の変異もしくは欠失、またはＣｙｓ５０７およびＣｙｓ５０９の欠失を有する、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２、またはこれらのバリアントを含む。これらの位置における例示的な変異としては、例えば、システインのセリン、アラニン、ロイシン、バリン、またはグリシンへの変異がある。ある特定の実施形態では、特定のシステイン置換のためのアミノ酸残基は、他の種および生物に由来するＨＲＳオルソログ中に見つかる天然に存在する置換から選択することができる。このタイプの例示的な置換を、表Ｄ７に提示する。

【０３６６】

【表Ｄ７】

表 D7

ヒトHRS中のシステイン残基によって占有されている位置における天然に存在する配列バリエーション

H.sapiens システイン 残基番号	P.troglodyte	M.mulatta	B.aturus	M.musculus	R.norvegicus	G.gallus	X.laevis	D.rerio	D.melanogaster	C.elegans	S.cerevisiae	E.coli
83	C	C	C	C	C	C	C	C	V	T	L	V
174	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	L
191	C	C	C	C	C	C	C	C	C	V	C	A/L
196	C	C	C	C	C	Q	H	Y	S	M	V	L/A
224	C	C	C	C	C	C	C	C	C	S	A	A
235	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	S	E
379	C	C	C	C	C	C	C	V	C	C	C	A
455	C	C	C	C	C	C	C	-	C	C	A	A
507	C	R	C	S	S	-	-	-	-	S/Q	S/E	-
509	C	C	C	C	-	-	-	-	-	I	I/G	-

【０３６７】

いくつかの実施形態では、変異誘発のために選択される天然に存在するシステイン残基は、これらの表面曝露に基づいて同定または選択される。したがって、いくつかの態様では、置換のために選択されるシステイン残基は、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される。いくつかの実施形態では、配列番号１の最後の３つの（Ｃ－末端）残基が、残基５０７～５０９を欠失させるように欠失される。いくつかの実施形態では、システインは、分子内システイン対、例えば、Ｃｙｓ１７４およびＣｙｓ１９１を排除するように、変異または欠失のために選択される。

【０３６８】

表面曝露したシステイン残基を低減するために望まれるシステイン変異／置換（太い下線で示されている）の具体的な追加の例は、表Ｄ８で以下に列挙されたものを含む。

【０３６９】

【表Ｄ８－１】

表 D8
表面曝露したシステインを除去するための置換を有するHRSポリペプチド

名称	タンパク質配列	配列番号
HRS(1-506) C174A	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ**A**DFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	176
HRS(1-506) C174V	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ**V**DFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEIL	177

【表Ｄ８－２】

	SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	
HRS(1-506) C191A	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAE**A**LKIMCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	178
HRS(1-506) C191S	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAE**S**LKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKN EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPL	179
HRS(1-506) C191V	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAE**V**LKIMCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	180
HRS(1-506) C224S	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAI**S**GVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEEVKN EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPL	181
HRS(1-506) C235S	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTI**S**SSVDKLDKVSWEEVKN EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ	182

【表Ｄ８－３】

	LQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPL	
名称	**DNA 配列**	**配列番号**
HRS(1-506) C174A	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGGCTGATTTTGA TATTGCCGGAAATTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	183
HRS(1-506) C174V	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGGTTGATTTTGA TATTGCCGGAAATTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC	184

【表Ｄ８－４】

	GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	
HRS(1-506) C191A	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAAATTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGGCTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	185
HRS(1-506) C191S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAAATTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGAGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT	186

【表Ｄ８－５】

	GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	10
HRS(1-506) C191V	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAAATTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGGTTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	187
HRS(1-506) C224S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAAATTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTCCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG	188

【表Ｄ８－６】

	GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	
HRS(1-506) C235S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAAATTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTCCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	189

【０３７０】

いくつかの実施形態では、このようなシステイン置換された変異体は、規定された表面曝露した位置で新しい表面曝露したシステイン残基を操作して入れ、挿入し、または他の方法で導入するように修飾され、この場合、導入される残基は、ＨＲＳポリペプチドの非カノニカル活性を実質的に妨害しない。具体例には、例えば、上述したシステイン低減済みＨＲＳポリペプチドのいずれかのＮ－末端またはＣ－末端における追加のシステイン残基の挿入（または再挿入）が含まれる。いくつかの実施形態では、このようなＮ－末端またはＣ－末端の表面曝露したシステインの挿入では、ＨＲＳポリペプチドのシステイン低減済みバリアントへの全長ヒトＨＲＳの最後の１個、最後の２個、または最後の３個の天然に存在するＣ－末端アミノ酸が再挿入され、例えば、配列ＣＩＣ（Ｃｙｓ　Ｉｌｅ　Ｃ

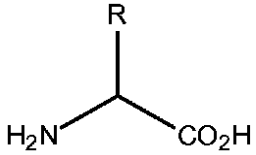
ｙｓ）のすべてまたは一部が再挿入される。例示的なシステイン低減済み変異体としては、例えば、配列番号１～１０６、１３１～１３３、１３７～１４３、１７８、１８０、１８２、１８４、もしくは１８６～１９５のＨＲＳポリペプチド配列のいずれか、または表Ｄ１～Ｄ９に列挙した、もしくはこれらから導き出せるＨＲＳポリペプチドのいずれかのいずれかにおける、残基Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、およびＣｙｓ２３５における変異（もしくはこれらの欠失）、ならびに／またはＣｙｓ５０７およびＣｙｓ５０９の欠失もしくは置換（全長ヒトＨＲＳ（配列番号１）の番号付けに基づく）の任意の組合せがある。

【０３７１】

様々な実施形態では、本発明は、官能基を必要に応じて含む天然に存在しないアミノ酸を置換することによる、ＨＲＳポリペプチド中の任意のアミノ酸位置における修飾を企図する。非天然アミノ酸は、例えば、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれか１つ（または表Ｄ１～Ｄ９に列挙した、もしくはこれらから導き出せるＨＲＳポリペプチドのいずれか）のＮ－末端および／またはＣ－末端と比べて、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、または２５アミノ酸以内の残基の１つまたは複数において；配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれか１つ（または表Ｄ１～Ｄ９に列挙した、もしくはこれらから導き出せるＨＲＳポリペプチドのいずれか）のＮ－末端および／またはＣ－末端において；あるいは本明細書に記載の溶媒アクセス可能な表面アミノ酸残基において挿入あるいは置換することができる。

特定の実施形態では、天然に存在しないアミノ酸としては、限定することなく、セレノシステインおよび以下の２０の遺伝的にコードされるアルファ－アミノ酸、即ち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン以外の任意のアミノ酸、修飾アミノ酸、またはアミノ酸類似体がある。アルファ－アミノ酸の一般的な構造は、以下の式によって例示される。

【化１】



【０３７２】

非天然アミノ酸は一般に、Ｒ基が２０の天然アミノ酸で使用されるもの以外の任意の置換基である、前述の式を有する任意の構造である。例えば、２０の天然アミノ酸の構造については、Ｌ．　StryerによるBiochemistry、３版、１９８８年、Freeman　and　Company、New　Yorkなどの生化学の教科書を参照。本明細書に開示の非天然アミノ酸は、上記２０のアルファ－アミノ酸以外の天然に存在する化合物であり得ることに留意されたい。本明細書に開示の非天然アミノ酸は一般に、側鎖のみにおいて天然アミノ酸と異なるので、非天然アミノ酸は、例えば、天然または非天然の他のアミノ酸とアミド結合を、これらが天然に存在するタンパク質中で形成される同じ様式で形成する。しかし、非天然アミノ酸は、これらを天然アミノ酸と区別する側鎖基を有する。例えば、前述の式中のＲは、アルキル－、アリール－、アリールハロゲン化物、ハロゲン化ビニル、アルキルハライド、アセチル、ケトン、アジリジン、ニトリル、ニトロ、ハロゲン化物、アシル－、ケト－、アジド－、ヒドロキシル－、ヒドラジン、シアノ－、ハロ－、ヒドラジド、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオエーテル、エポキシド、スルホン、ボロン酸、ボロン酸エステル、ボラン、フェニルボロン酸、チオール、セレノ－、スルホニル－、ボレート、ボロネ

ート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式－、ピリジル、ナフチル、ベンゾフェノン、シクロオクチンなどの束縛された環、チオエステル、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミン、アミノ、カルボン酸、アルファ－ケトカルボン酸、アルファもしくはベータ不飽和酸およびアミド、グリオキシルアミド、または有機シラン基など、あるいはこれらの任意の組合せを必要に応じて含む。

【０３７３】

非天然アミノ酸の具体例としては、それだけに限らないが、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃβ－セリン、β－Ｏ－ＧｌｃＮＡｃ－Ｌ－セリン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧａｌＮＡｃ－α－トレオニン、α－ＧａｌＮＡｃ－Ｌ－トレオニン、Ｌ－ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、ｐ－ヨード－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、以下で、または本明細書の他で列挙されるものなどがある。

【０３７４】

したがって、異種部分、例えば、ＰＥＧ部分の任意の好適な官能基と共有結合を形成する官能基を含む天然に存在しないアミノ酸を選択することができる。非天然アミノ酸は、選択した後、供給業者から購入し、または化学合成することができる。非天然アミノ酸の任意の数を、標的分子中に組み込むことができ、付着される所望の水溶性ポリマー、例えば、ＰＥＧ部分の数によって変更することができる。この部分は、非天然アミノ酸のすべて、またはいくつかのみに付着させることができる。さらに、同じまたは異なる非天然アミノ酸を、所望の結果に応じて、ＨＲＳポリペプチド中に組み込むことができる。ある特定の実施形態では、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上の非天然アミノ酸がＨＲＳポリペプチド中に組み込まれ、これらのいずれかまたはすべてを、所望の官能基を含む異種部分にコンジュゲートすることができる。

【０３７５】

本発明のある特定の実施形態は、本明細書に記載の、ＨＲＳポリペプチドの所望の特性を改善した修飾を含めて、修飾ＨＲＳポリペプチドの使用も企図する。本発明のＨＲＳポリペプチドの修飾は、アセチル化、ヒドロキシル化、メチル化、アミド化、ならびに融合タンパク質、炭水化物部分または脂質部分の付着、補助因子、Ｄアミノ酸の置換などを含む、側鎖修飾、主鎖修飾、ならびにＮ－末端およびＣ－末端修飾を含めた、１つまたは複数の構成アミノ酸における化学的ならびに／または酵素的誘導体化を含む。例示的な修飾には、ＨＲＳポリペプチドのＰＥＧ化も含まれる（例えば、ともに参照により本明細書に組み込まれている、VeroneseおよびHarris、Advanced Drug Delivery Reviews、５４巻：４５３～４５６頁、２００２年；ならびにPasutら、Expert Opinion. Ther. Patents、１４巻（６号）、８５９～８９４頁、２００４年を参照）。いくつかの実施形態では、このようなＰＥＧ化ＨＲＳポリペプチドは、外因性もしくは内因性システイン、または他の残基を介した選択的カップリングを可能にするように、内因性システインを付加または除去するための変異を含む。

【０３７６】

ＰＥＧは、水中および多くの有機溶媒中での溶解度、毒性の欠如、ならびに免疫原性の欠如という性質を有する周知のポリマーである。これは、透明、無色、無臭、および化学的に安定でもある。これらの理由または他の理由で、ＰＥＧは、付着させるのに好適なポリマーとして選択されているが、単に実例の目的および限定しない目的で使用されている。同様の生成物を、限定することなく、ポリビニルアルコール、ポリ（プロピレングリコール）などの他のポリ（アルキレンオキシド）、ポリ（オキシエチレン化グリセロール）などのポリ（オキシエチレン化ポリオール）、カルボキシメチルセルロース、デキストラ

ン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン（polyvinyl purrolidone）、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸、およびポリアミノ酸を含めた他の水溶性ポリマーを用いて得ることができる。当業者は、所望の投与量、循環時間、タンパク質分解に対する耐性、および他の考慮事項に基づいて所望のポリマーを選択することができる。

【０３７７】

特に、多種多様なＰＥＧ誘導体が、ＰＥＧ－コンジュゲートの調製における使用に利用可能および適当の両方である。例えば、商標ＳＵＮＢＲＩＧＨＴ（登録商標）シリーズの下で販売されているＮＯＦ Ｃｏｒｐ．のＰＥＧ試薬は、ＡＡＲＳポリペプチドのＮ－末端、Ｃ－末端、または任意の内部アミノ酸への様々な方法によるカップリングのための、メトキシポリエチレングリコール、およびメトキシ－ＰＥＧアミンなどの活性化ＰＥＧ誘導体、マレイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、およびカルボン酸を含めた多数のＰＥＧ誘導体を提供する。Ｎｅｋｔａｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓの高度ＰＥＧ化技術も、ＨＲＳポリペプチド系治療剤の安定性および効力を潜在的に改善するための多様なＰＥＧカップリング技術を提供する。

【０３７８】

特許、公開特許出願、および関連刊行物も、本開示を読んでいる当業者に、重要な可能性があるＰＥＧ－カップリング技術およびＰＥＧ誘導体を提供する。例えば、米国特許第６，４３６，３８６号、同第５，９３２，４６２号、同第５，９００，４６１号、同第５，８２４，７８４号、および同第４，９０４，５８４号を参照。これらの内容は、その全体が参照により組み込まれており、このような技術および誘導体、ならびにこれらを製造するための方法を記載するものである。

【０３７９】

ある特定の態様では、化学選択的ライゲーション技術を利用して、部位特異的でコントロールされた様式でポリマーを付着させることなどによって、本発明のＨＲＳポリペプチドを修飾することができる。このような技術は一般に、化学的または組換え手段によってタンパク質骨格内に化学選択的アンカーを組込み、引き続いて相補的リンカーを担持するポリマーで修飾することを利用する。結果として、得られるタンパク質－ポリマーコンジュゲートのアセンブリープロセスおよび共有構造をコントロールすることができ、効力および薬物動態学的性質などの薬物性質の道理にかなった最適化を可能にする（例えば、Kochendoerfer、Current Opinion in Chemical Biology、９巻：５５５～５６０頁、２００５年を参照）。

【０３８０】

他の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドの他のタンパク質への融合タンパク質も含まれ、これらの融合タンパク質は、ＨＲＳポリペプチドの生物活性、分泌、抗原性、ターゲッティング、生物学的寿命、細胞膜もしくは血液脳関門を貫通する能力、または薬物動態学的性質を調節することができる。薬物動態学的性質を改善する融合タンパク質（「ＰＫモディファイヤー」）の例としては、限定することなく、ヒトアルブミン（Osbornら：Eur. J. Pharmacol.、４５６巻（１～３号）：１４９～１５８頁、（２００２年））、抗体Ｆｃドメイン、ポリＧｌｕまたはポリＡｓｐ配列、およびトランスフェリンへの融合物がある。さらに、アミノ酸Ｐｒｏ、Ａｌａ、およびＳｅｒから構成されている（「ＰＡＳ化」）コンホメーション的に無秩序なポリペプチド配列、またはヒドロキシエチルデンプン（商標ＨＥＳＹＬＡＴＩＯＮ（登録商標）の下で販売されている）との融合物は、ＨＲＳポリペプチドの流体力学的体積を増大させる単純な方法を提供する。この追加の伸長は、嵩高いランダムな構造をとり、それは、得られる融合タンパク質のサイズを著しく増大させる。この手段によって、腎臓濾過を介したより小さいＨＲＳポリペプチドの一般に急速なクリアランスが数桁遅延される。さらに、ＩｇＧ融合タンパク質を使用すると、いくつかの融合タンパク質が血液脳関門を貫通することが可能になることも示された（Fuら、（２０１０年）Brain Res.、１３５２巻：２０８～１３頁）。

【０３８１】

ＨＲＳポリペプチドの抗原性または免疫調節性を調節する融合タンパク質の例としては、例えば、ＭＨＣクラスＩおよびＩＩタンパク質、ｂ－２ミクログロブリン、ＬＦＡ－３の部分、重鎖のＦｃ領域の部分、ならびにこれらのコンジュゲートおよび誘導体を含めたＴ細胞結合リガンドへの融合物がある。このような融合タンパク質の例は、例えば、ＥＰ１９６４８５４、米国特許第５，４６８，４８１号、同第５，１３０，２９７号、同第５，６３５，３６３号、同第６，４５１，３１４号、およびＵＳ２００９／０２８０１３５に記載されている。

【０３８２】

さらに、いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、十分に特徴付けられた分泌タンパク質に由来する合成の、または天然に存在する分泌シグナル配列を含み得る。いくつかの実施形態では、このようなタンパク質は、ｉｎ　ｓｉｔｕでＨＲＳポリペプチドを形成するために、タンパク質分解的切断によって加工することができる。いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドは、細胞内または細胞外の位置でＨＲＳポリペプチドのｉｎ　ｓｉｔｕ発現および産生を可能にするための異種タンパク質分解的切断部位を含み得る。他の融合タンパク質は、例えば、新しいＮ－末端アミノ酸を提供するためのユビキチンへのＨＲＳポリペプチドの融合、または細胞外媒体中へのＨＲＳポリペプチドの高レベル分泌を媒介するための分泌シグナルの使用、または精製もしくは検出を改善するためのＮ－末端もしくはＣ－末端エピトープタグも含み得る。

【０３８３】

ある特定の態様では、非天然アミノ酸の使用を利用して、ＨＲＳポリペプチドの選択された非カノニカル活性を調節し（例えば、増大させ）、またはタンパク質のｉｎ　ｖｉｖｏもしくはｉｎ　ｖｉｔｒｏ半減期を変更することができる。非天然アミノ酸は、本明細書の他で記載されているように、ＨＲＳタンパク質の（選択的な）化学修飾（例えば、ＰＥＧ化）を促進するために使用することもできる。例えば、ある特定の非天然アミノ酸は、ＰＥＧなどのポリマーの所与のタンパク質への選択的付着を可能にし、それによってこれらの薬物動態学的性質を改善する。

【０３８４】

アミノ酸類似体および模倣体の具体例は、例えば、RobertsおよびVellaccio、The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology、GrossおよびMeinhofer編、５巻、３４１頁、Academic Press,Inc.、New York、N.Y.（１９８３年）に見つけることができ、その全量は、参照により本明細書に組み込まれている。他の例としては、過アルキル化アミノ酸、特に、過メチル化アミノ酸がある。例えば、その書籍全体が参照により本明細書に組み込まれている、Combinatorial Chemistry、WilsonおよびCzarnik編、１１章、２３５頁、John Wiley & Sons Inc.、New York、N.Y.（１９９７年）を参照。さらに他の例としては、アミド部分（およびしたがって、得られるペプチドのアミド骨格）が、例えば、糖環、ステロイド、ベンゾジアゼピン、またはカルボサイクルによって置き換えられたアミノ酸がある。例えば、その書籍全体が参照により本明細書に組み込まれている、Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery、Manfred E. Wolff編、１５章、６１９～６２０頁、John Wiley & Sons Inc.、New York、N.Y.（１９９５年）を参照。ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、およびタンパク質を合成するための方法は、当技術分野で周知である（例えば、それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第５，４２０，１０９号；M. Bodanzsky、Principles of Peptide Synthesis（１版＆第２改訂版）、Springer-Verlag、New York、N.Y.（１９８４＆１９９３）（７章を参照）；StewartおよびYoung、Solid Phase Peptide Synthesis、（２版）、Pierce Chemical Co.、Rockford、Ill.（１９８４年）を参照）。したがって、本発明のＨＲＳポリペプチドは、天然に存在する、および天然に存在しないアミノ酸ならびにアミノ酸類似体および模倣体から構成され得る。

【０３８５】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチド、例えば、システイン含量が低減されたＨＲＳポリペプチドは、同一の、またはその他は

同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチド（例えば、野生型全長ヒトＨＲＳ（配列番号１）；野生型システイン残基を有する対応するＨＲＳ断片または配列）と比べて、生化学的、物理的、および／または薬物動態学的性質が変化している（例えば、改善、増大、減少、低減している）。いくつかの実施形態では、生化学的、物理的、および／または薬物動態学的性質が変更された修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、本明細書に記載したように、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９の任意の１つまたは複数の変異（例えば、欠失、置換）を有する。具体的な実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、Ｃｙｓ５０７およびＣｙｓ５０９の変異、例えば、残基５０７～５０９の欠失（Δ５０７～５０９）を有する。いくつかの修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、配列番号１（またはそのバリアント）の残基１～５０６または２～５０６を含むが、配列番号１の残基５０７～５０９を欠き（ＨＲＳ（１～５０６）、ＨＲＳ（２～５０６）とも呼ばれる）、必要に応じて、全長ヒトＨＲＳ（配列番号１）と比べて、生化学的、物理的、および／または薬物動態学的性質が改善されている。

【０３８６】

生化学的、物理的、および薬物動態学的性質の例としては、限定することなく、絶対生物活性（例えば、非カノニカル活性）、安定性（例えば、半減期、動態学的または熱安定性、機能安定性、酸化に対する感受性）、溶液中の透明度（例えば、濁度、不透明度）、溶液中の凝集体形成、溶液中の均一性または単分散（例えば、単量体／二量体または単量体／オリゴマー形態の比の変化、鎖間ジスルフィド結合形成のレベルの変化）、免疫原性、交差反応性、非特異的結合、Ｅ．ｃｏｌｉなどの細菌中の発現の改善（例えば、エンドトキシン混入の低減、均一性の改善、電荷均一性の改善）、可溶性タンパク質の収率の改善、エンドトキシン結合の改善、溶液中の分解の程度、生物学的利用能（吸収される薬物の画分）、組織分布、分布の体積（薬物が静脈内注射され、血漿と周囲組織との間で平衡化された直後に薬物が分布している見かけ上の体積）、濃度（血漿中の薬物の初期状態または定常状態の濃度）、消失速度定数（薬物が体から除去される速度）、消失速度（消失を均衡させるのに要求される注入の速度）、曲線下面積（ＡＵＣ；単回投与後または定常状態における濃度－時間曲線の積分）、クリアランス（単位時間当たりに薬物がクリアされる血漿の体積）、C_{max}（経口投与後の薬物のピーク血漿濃度）、t_{max}（C_{max}に到達する時間）、C_{min}（次の用量が投与される前に薬物が到達する最低濃度）、および変動（定常状態における一投薬間隔内のピークトラフ変動）がある。

【０３８７】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、哺乳動物に投与した後、対応する無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドより、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００倍大きい、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％大きい、血漿または血清薬物動態学的ＡＵＣプロファイルを有する。

【０３８８】

いくつかの態様では、これらの性質の改善は、バリアントまたは修飾ＨＲＳポリペプチドの二次構造を著しく変更することなく、かつ／またはその非カノニカル生物活性を低減することなく実現される。実際に、いくつかのバリアントまたは修飾ＨＲＳポリペプチドは、非カノニカル生物活性が増大している。例えば、いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて（例えば、絶対）生物活性が増大している。例示的な活性としては、本明細書に記載の非カノニカル活性のいずれか、例えば、抗炎症活性、および抗Ｊｏ－１抗体または他の細胞結合剤に結合する能力などがある。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修

飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドより、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００倍大きい、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％大きい生物活性を有する。

【０３８９】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて全長無修飾タンパク質（配列番号１）と比較して、Ｊｏ－１抗体への結合に対してより低いIC_{50}（即ち、より高い結合親和性）を有する。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドより、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、または５００％低い、Ｊｏ－１競合性ＥＬＩＳＡにおけるIC_{50}を有する。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、約０．２ｎＭ未満、約０．１８ｎＭ未満、約０．１６ｎＭ未満、または約０．１５ｎＭ以下である、Ｊｏ－１競合性ＥＬＩＳＡにおけるIC_{50}を有する。

【０３９０】

ある特定の実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドより、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００倍大きく、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％大きく、「安定性」が増大している（例えば、半減期によって測定した場合、タンパク質分解の速度）。特定の実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、所与のセットの条件（例えば、温度、ｐＨ）下で、少なくとも約３０分、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約１２時間、約１８時間、約２４時間、約３６時間、約４８時間、約６０時間、約７２時間、約８４時間、約９６時間、約１２０時間、約１４４時間、約１６８時間、約１９２時間、約２１６時間以上、約２４０時間以上の半減期、または任意の介在する半減期もしくは間の範囲を有する。

【０３９１】

いくつかの実施形態では、ＨＲＳポリペプチドの「安定性」には、「機能安定性」、または少なくとも１つの生物活性が所与のセットの条件下で経時的に低減される速度が含まれる。例示的な生物活性は、本明細書に記載の非カノニカル活性、およびヒトＨＲＳに対する自己抗体に関連した疾患に由来する自己抗体または反応性Ｔ細胞と特異的に交差反応する少なくとも１種のエピトープの保持のうちの任意の１つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドの生物活性は、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドより、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００倍遅い、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％遅い速度で低減される。

【０３９２】

ある特定の実施形態では、ＨＲＳポリペプチドの「安定性」には、所与のセットの条件下で経時的な、アンフォールディングのその速度を含めた、「動態学的安定性」または「熱安定性」が含まれる。動態学的に安定であるタンパク質は、動態学的に不安定なタンパク質よりゆっくりとアンフォールドする。動態学的に安定なタンパク質では、アンフォー

ルディングに対する大きな自由エネルギーバリアが要求され、安定性に影響する要因は、アンフォールディング経路に対する最初の関与段階について、フォールド状態（G_f）および遷移状態（G_{ts}）の相対自由エネルギーである。アンフォールドタンパク質が凝集またはタンパク質分解などの何らかの永続的な変化を急速に受ける場合、タンパク質は不可逆的に変性し得る。特定の実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドより、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００倍遅い、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％遅い速度でアンフォールドする。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドの融解温度（Ｔｍ）より、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％高い融解温度を有する。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドより、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０℃高い融解温度（Ｔｍ）を有する。融解温度は、例えば、示差走査蛍光定量（ＤＳＦ）によって測定することができる。

【０３９３】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、溶液中の均一性または単分散（例えば、モノマー／オリゴマーの比、二量体／オリゴマーの比、モノマー／二量体の比、二量体／モノマーの比、還元条件下での鎖間ジスルフィド形成の比、ＳＤＳ－ＰＡＧＥまたはＨＰＬＣ分析によって検出される高分子量または低分子量ピークの低減を含めた、見かけ上の分子量の分布）が改善され、または増大している。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドの均一性または単分散は、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００倍、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％増大している。特定の実施形態では、Ｃ－末端システイン残基Ｃｙｓ５０７およびＣｙｓ５０９の欠失（Δ５０７～５０９）または置換を有するＨＲＳポリペプチドは、Ｃｙｓ５０７／Ｃｙｓ５０９の一方または両方を有する対応するＨＲＳポリペプチド（例えば、配列番号１）と比べて、溶液中の均一性（例えば、モノマー／オリゴマーの比）が増大している。いずれの１つの理論にも束縛されることを望むことなく、全長ヒトＨＲＳは、Ｃ－末端システイン残基Ｃｙｓ５０７／Ｃｙｓ５０９を介してオリゴマー形成するので、これらのシステイン残基の一方または両方が置換または欠失すると、溶液（例えば、生理的緩衝液、医薬組成物／治療用組成物、血液または血漿などの生体液）中のＨＲＳポリペプチドの均一性が増大し得る。具体的な実施形態では、バリアントＨＲＳポリペプチドは、ＨＲＳ（１～５０６）（配列番号７０）またはＨＲＳ（２～５０６）である。溶液中のモノマーの均一性が増大すると、例えば、生物活性、安定性、および本明細書に記載の他の性質も増大し得る。

【０３９４】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、溶液中の濁度（例えば、粒子または繊維形成

の程度）が低減されている。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドの濁度は、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、約もしくは少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００分の１、または約もしくは少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％低減されている。濁度は、例えば、Ａ３４０での吸光度によって測定することができる。

【０３９５】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、溶液中の不透明度が低減されている。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドの不透明度は、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００分の１、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％低減されている。不透明度は、例えば、Ａ５８０での吸光度によって測定することができる。

【０３９６】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、溶液中の凝集体（例えば、高分子量凝集体、低分子量凝集体）が低減されている。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドの凝集体形成は、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、約もしくは少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００分の１、または約もしくは少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％低減されている。凝集は、例えば、サイズ排除ＨＰＬＣまたはＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって測定することができる。より高いレベルの凝集は、本明細書に記載されるように、濁度測定によっても監視することができる。

【０３９７】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べてＥ．ｃｏｌｉ中の収率が改善されている。いくつかの実施形態では、収率は、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、少なくとも約１．２、１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０倍、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％改善されている。

【０３９８】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、Ｅ．ｃｏｌｉから発現させ、精製した後の純度が増大し、かつ／またはエンドドキシン含量が低減されている。いくつかの実施形態では、エンドトキシンレベルは、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、少なくとも約１．２、１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０分の１、または少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％低減されている。

【０３９９】
いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドは、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、溶液中の断片化が低減されている。いくつかの実施形態では、修飾またはバリアントＨＲＳポリペプチドの断片化の程度は、同一の、またはその他は同等の条件下で、無修飾または非バリアントＨＲＳポリペプチドと比べて、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、もしくは２００分の１、または少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％、もしくは５００％低減されている。断片化は、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析およびサイズ排除ＨＰＬＣによって測定することができる。

【０４００】
本明細書に記載の生化学的、物理的、および／または薬物動態学的性質のいずれかを測定するための例示的な条件には、「生理的条件」、例えば、約２０～４０℃の温度範囲、約１の大気圧、および約６～８のｐＨなどが含まれる。条件の一般的な例としては、限定することなく、哺乳動物に投与した後のｉｎ　ｖｉｖｏ条件、生体液（例えば、血液、血清、組織培養）中のｉｎ　ｖｉｔｒｏまたは溶液条件、および生理的緩衝液または医薬組成物／治療用組成物中のｉｎ　ｖｉｔｒｏまたは溶液条件がある。例示的な医薬組成物／治療用組成物は、本明細書の他で記載されている。いくつかの実施形態では、条件は、間のすべての整数および範囲を含めて、約－８０、－６０、－４０、－２０、－１０、－５、－４、－３、－２０、－２、－１、０、１、２、３、４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９９、または１００℃の温度を含む。いくつかの実施形態では、条件は、間のすべての整数および範囲を含めて、約６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８．０のｐＨを含む。

【０４０１】
本明細書に記載の薬物動態学的、生化学的、および／または物理的性質は、任意の所与の条件または変化中の条件（例えば、漸増温度）下で、約０．２５、０．５、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、もしくは２４時間、または約０．１、０．２５、０．５、０．７５、１、１．５、２、２．５、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４日、または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０、もしくは２４週間、または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、もしくは１２カ月などにわたって測定することができる。いくつかの実施形態では、薬物動態学的、生化学的、および／または物理的性質は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上の回数、組成物を凍結融解させた後に測定される。

【０４０２】
ＨＲＳポリヌクレオチド
ある特定の実施形態は、ＨＲＳポリペプチドのトランケーション体および／またはバリアントを含めた、ＨＲＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにこのようなポリヌクレオチドを含む組成物に関する。諸使用の中でも、これらの実施形態は、所望のＨＲＳポリペプチドもしくはそのバリアントを組換えによって産生させるのに、または選択された細胞もしくは被験体内でＨＲＳポリペプチドを発現させるのに利用することができる。天然ＨＲＳポリペプチドをコードする代表的な天然に存在するヌクレオチド配列としては、例えば、ＧｅｎｅＢａｎｋ受託番号ＡＫ０００４９８．１およびＵ１８９３７．１がある。

【０４０３】
本明細書において使用する場合、用語「ＤＮＡ」および「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、特定の種の総ゲノムＤＮＡを含まない、単離されたＤＮＡ分子を指す。したがって、ポリペプチドをコードするＤＮＡセグメントは、１種または複数種のコード配列を含有するが、ＤＮＡセグメントが得られる種の総ゲノムＤＮＡから、実質的に離れて単離された、またはそれから解放されて精製されたＤＮＡセグメントを指す。ＤＮＡセグメントおよびこのようなセグメントのより小さい断片、ならびにまた、例えば、プラスミド、コスミド、ファージミド、ファージ、ウイルスなどを含めた組換えベクターは、用語「ＤＮＡセグメント」ならびに「ポリヌクレオチド」の中に含まれる。

【０４０４】
当業者が理解することになるように、本発明のポリヌクレオチド配列は、ゲノム配列、ゲノム外配列、およびプラスミドにコードされた配列、ならびにタンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現し、または発現するように適合され得る、より小さい操作された遺伝子セグメントを含み得る。このようなセグメントは、天然に単離される場合があり、または人の手で合成的に修飾される場合がある。

【０４０５】
ポリヌクレオチドは、一本鎖（コードまたはアンチセンス）であっても、二本鎖であってもよく、ＤＮＡ（ゲノム、ｃＤＮＡ、または合成）分子であっても、ＲＮＡ分子であってもよい。追加のコード配列または非コード配列が、本発明のポリヌクレオチドの中に存在していてもよいが、存在している必要はなく、ポリヌクレオチドは、他の分子および／または支持材料に連結されていてもよいが、連結されている必要はない。

【０４０６】
ポリヌクレオチドは、天然配列（即ち、ＨＲＳポリペプチドもしくはその部分をコードする内在性配列）を含み得、またはバリアント、もしくはこのような配列の生物学的機能的等価物を含み得る。ポリヌクレオチドバリアントは、以下でさらに記載されるように、１つまたは複数の置換、付加、欠失、および／または挿入を含有することができ、好ましくはその結果、コードされるポリペプチドの炎症反応調節活性は、無修飾ポリペプチドと比べて実質的に減少していない。コードされるポリペプチドの炎症反応調節活性に対する効果は一般に、本明細書に記載されるように評価することができる。

【０４０７】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＨＲＳポリペプチドと同一の、または相補的な配列の様々な長さの連続ストレッチを含む単離ポリヌクレオチドであって、本明細書に記載のトランケートされたＨＲＳポリペプチドをコードする、単離ポリヌクレオチドを提供する。

【０４０８】
遺伝子コードの縮退の結果として、本明細書に記載のＨＲＳポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列が存在することが当業者によって理解される。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、任意の天然遺伝子のヌクレオチド配列と最小の相同性を有する場合がある。それにもかかわらず、コドン使用頻度の差異によって変化するポリヌクレオチド、例えば、ヒト、酵母、または細菌のコドン選択に対して最適化されたポリヌクレオチドは、本発明によって具体的に企図されている。

【０４０９】
したがって、複数のポリヌクレオチドが本発明のＨＲＳポリペプチドをコードすることができる。さらに、ポリヌクレオチド配列は、様々な理由でマニピュレートされ得る。例としては、それだけに限らないが、様々な生物においてポリヌクレオチドの発現を増強するための好適なコドンの組込みがある（一般に、Nakamuraら、Nuc. Acid. Res.、２８巻（１号）：２９２頁、２０００年を参照）。さらに、制限部位を導入もしくは排除し、ＣｐＧジヌクレオチドモチーフの密度を減少させ（例えば、Kamedaら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、３４９巻（４号）：１２６９～１２７７頁、２００６年を参照）、または一本鎖配列がステムループ構造を形成する能力を低減するために、サイレント変異

を組み込むことができる（例えば、Zuker M.、Nucl. Acid Res.、３１巻（１３号）：３４０６～３４１５頁、２００３年を参照）。さらに、哺乳動物の発現は、開始コドンにおいてコザック共通配列［即ち、（ａ／ｇ）ｃｃ（ａ／ｇ）ｃｃＡＴＧｇ；配列番号１３０］を含めることによってさらに最適化され得る。この目的に有用なコザック共通配列は、当技術分野で公知である（Mantyhら、PNAS.、９２巻：２６６２～２６６６頁、１９９５年；Mantyhら、Prot. Exp. & Purif.、６巻、１２４頁、１９９５年）。例示的なコドン最適化ポリヌクレオチド配列を以下の表Ｄ９に提供する。

【０４１０】

【表Ｄ９－１】

表D9
コドン最適化DNA配列

名称	配列番号1のアミノ酸残基範囲	核酸配列	配列番号
野生型(全長HisRS)	1-509	ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCAGGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGCGCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACTGAAGGCACAGCTGGGTCCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTGTGCTCAAAACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGGCAGATGGCAGTTCGCGAGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATACACCTGT	24

【表Ｄ９－２】

		ATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAG ACTCCAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAG CTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTCCTTTTGCTCGGT ATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTACCAC ATAGCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCG TGGCCGATACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGC TGGGAACTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAA GATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTCAGATAGGCGACTT CCTGGTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGT TTGCTATCTGTGGTGTTTCTGACAGCAAGTTCCGTACCATCT GCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGTCCTGGGAAGAG GTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGCACCTGA GGTGGCTGACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTG GGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTAT CCCAAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGAAG TTGCTCTTTGAGTACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAA ATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTAC ACTGGGGTGATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCCAGC CCAGGCAGGGGAAGAGCCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTG CTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTCGACCCC AAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGT GGAGCGGATTTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTT TGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTG GCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCT TGTCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGC TGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAACCAGTTACAGTAC TGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGA GCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCAGTGA CGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTG GAGGAAATCAAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCTCTGCATCTG C	
$HisRS1^{N1}$	1-141	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTCGCTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACTGATTTATGACCTGAAAGATCAGGGTGGTGAACTG CTGAGTCTGCGCTATGATCTGACAGTTCCGTTTGCCCGTTAT CTGGCAATG	25
$HisRS1^{N2}$	1-408	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTCGCTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACTGATTTATGACCTGAAAGATCAGGGTGGTGAACTG CTGAGTCTGCGCTATGATCTGACAGTTCCGTTTGCCCGTTAT CTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTATCACAT TGCTAAAGTCTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACCCGTGG TCGTTATCGTGAGTTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCGG CAACTTTGATCCGATGATCCCGGATGCTGAATGCCTGAAAAT CATGTGTGAGATCCTGAGCAGTCTGCAGATTGGCGATTTCCT GGTGAAAGTCAACGATCGCCGTATTCTGGATGGCATGTTCGC CATCTGTGGTGTTAGCGACTCCAAATTCCGTACCATCTGTAG TAGTGTGGACAAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAGGAGGTGA	26

【表Ｄ９－３】

		AAAACGAAATGGTGGGCGAGAAAGGTCTGGCTCCTGAAGTG GCTGACCGTATTGGTGATTATGTCCAGCAGCACGGTGGAGT ATCACTGGTTGAGCAACTGCTGCAAGACCCTAAACTGAGTC AGAATAAACAGGCCCTGGAGGGACTGGGAGATCTGAAACTG CTGTTCGAGTATCTGACCCTGTTCGGTATCGATGACAAAATC TCCTTTGACCTGTCACTGGCTCGTGGACTGGACTATTATACC GGCGTGATCTATGAAGCTGTACTGCTGCAAACTCCAGCACA AGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTGGGTAGTGTAGCCGCTG GGGGACGTTATGATGGACTGGTGGGGATGTTCGACCCTAAA GGCCGTAAAGTTCCGTGTGTGGGTCTGAGTATCGGTGTTGAG CGTATCTTTTCCATCGTCGAGCAACGTCTGGAAGCACTGGAG GAAAAAATCCGTACGACCGAA	
$HisRS1^{N3}$	1-113	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTCGCTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACTG	27
$HisRS1^{N4}$	HRS(1-60)	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAG	28
$HisRS1^{N8}$	HRS(1-506)	ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCA GGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGC GCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACT GAAGGCACAGCTGGGTCCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTG TGCTCAAAACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGG CAGATGGCAGTTCGCGAGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCG TTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATACACCTGT ATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAG ACTCCAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAG CTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTCCTTTTGCTCGGT ATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTACCAC ATAGCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCG TGGCCGATACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGC TGGGAACTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAA GATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTCAGATAGGCGACTT CCTGGTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGT TTGCTATCTGTGGTGTTTCTGACAGCAAGTTCCGTACCATCT GCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGTCCTGGGAAGAG GTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGCACCTGA GGTGGCTGACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTG GGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTAT CCCAAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGAAG TTGCTCTTTGAGTACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAA ATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTAC ACTGGGGTGATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCCAGC CCAGGCAGGGGAAGAGCCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTG CTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTCGACCCC AAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGT GGAGCGGATTTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTT TGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTG GCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCT TGTCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGC TGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAACCAGTTACAGTAC TGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGA	72

【表Ｄ９－４】

		GCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCAGTGA CGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTG GAGGAAATCAAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCTC	
HisRS1^{N6}	HRS(1-48)	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGAT	73
HisRS1^{H}	191-333	TGCCTGAAAATCATGTGTGAGATCCTGAGTAGTCTGCAAATT GGCGACTTTCTGGTCAAAGTGAACGATCGCCGTATTCTGGAT GGCATGTTCGCCATCTGTGGTGTTAGCGACTCCAAATTCCGT ACAATCTGTAGCAGCGTGGACAAACTGGATAAAGTGTCCTG GGAAGAGGTGAAAAACGAAATGGTGGGTGAAAAAGGTCTG GCTCCGGAGGTTGCTGACCGTATCGGTGATTATGTTCAGCAG CACGGCGGTGTTAGTCTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCC GAAACTGTCTCAGAACAAACAGGCCCTGGAAGGACTGGGAG ATCTGAAACTGCTGTTCGAGTATCTGACGCTGTTCGGCATTG ATGACAAAATTTCTTTCGACCTGTCACTGGCACGTGGACTGG ACTATTATACCGGT	29
HisRS1^{C1}	405-509	CGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAA AAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGT GGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAAC CCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGG TATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAG ACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAA GTTGACGTTCGCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACG TCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	30
HisRS1^{N5}	1-243 + 27aa	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTCGCTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAAGGCGGTGAACTG CTGTCCCTGCGTTATGATCTGACTGTGCCGTTTGCCCGTTATC TGGCCATGAATAAACTGACGAACATTAAACGCTATCACATT GCCAAAGTGTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACTCGTGGA CGTTATCGTGAATTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCGGC AACTTCGACCCTATGATTCCGGATGCTGAATGCCTGAAAATC ATGTGTGAGATCCTGAGCAGCCTGCAAATTGGTGACTTCCTG GTGAAAGTGAATGACCGTCGTATCCTGGATGGCATGTTTGCC ATTTGTGGTGTGAGCGATTCCAAATTCCGTACCATCTGTAGT AGTGTGGACAAACTGGATAAAGTGGGCTATCCGTGGTGGAA CTCTTGTAGCCGTATTCTGAACTATCCTAAAACCAGCCGCCC GTGGCGTGCTTGGGAAACT	31
HisRS1^{C2}	1-60 + 175- 509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGACTTCGATATTGCCGGGAATTTTGA CCCTATGATCCCTGATGCCGAATGTCTGAAAATCATGTGTGA GATCCTGAGCAGTCTGCAGATTGGTGACTTCCTGGTGAAAGT GAACGATCGCCGTATTCTGGATGGAATGTTTGCCATTTGTGG CGTGTCTGACAGCAAATTTCGTACGATCTGTAGCAGCGTGGA TAAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAGGAGGTGAAAAATGAG ATGGTGGGCGAAAAAGGTCTGGCACCTGAAGTGGCTGACCG TATCGGTGATTATGTTCAGCAACATGGCGGTGTTTCTCTGGT CGAACAGCTGCTGCAAGACCCAAAACTGAGCCAGAACAAAC AGGCACTGGAAGGACTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTTGAG	32

【表Ｄ９－５】

		TATCTGACGCTGTTTGGCATCGATGACAAAATCTCGTTTGAC CTGAGCCTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACCGGCGTGATC TATGAAGCCGTCCTGCTGCAAACTCCAGCACAAGCAGGTGA AGAACCTCTGGGTGTTGGTAGTGTAGCGGCAGGCGGACGTT ATGATGGACTGGTGGGGATGTTTGATCCGAAAGGCCGTAAA GTTCCGTGTGTCGGTCTGAGTATCGGGGTTGAGCGTATCTTT AGCATTGTGGAGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAGGAAAAAAT CCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAA AAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGT GGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAAC CCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGG TATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAG ACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAA GTTGACGTTCGCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACG TCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	
HisRS1^{C3}	1-60＋211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGTGAATGATCGCCGTATCCTGGATG GCATGTTTGCCATTTGTGGTGTGAGCGACTCGAAATTCCGTA CGATTTGCTCTAGCGTCGATAAACTGGACAAAGTGTCCTGGG AAGAGGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAGGTCTGGC TCCTGAAGTTGCCGACCGTATTGGTGATTATGTTCAGCAGCA TGGCGGTGTTTCACTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCCGA AACTGTCTCAGAATAAACAGGCGCTGGAAGGACTGGGAGAT CTGAAACTGCTGTTTGAGTATCTGACCCTGTTCGGCATTGAT GACAAAATCAGCTTCGACCTGAGCCTGGCACGTGGTCTGGA TTATTATACCGGCGTGATCTATGAAGCCGTTCTGCTGCAGAC ACCAGCACAAGCAGGCGAAGAACCTCTGGGTGTTGGTTCTG TGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGACTGGTAGGCATGTTCG ATCCGAAAGGCCGTAAAGTTCCGTGTGTGGGACTGAGTATC GGTGTTGAGCGTATCTTTAGCATCGTGGAACAACGTCTGGAA GCGCTGGAGGAGAAAATTCGTACCACCGAAACCCAAGTTCT GGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGA AACTGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAA CTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCA GTATTGTGAGGAAGCGGGTATTCCTCTGGTGGCCATTATCGG AGAACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCG TGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCGCCGTGAAGATCTGG TCGAGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTT GC	33
HisRS1^{C4}	1-100＋211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTCGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGTGAACGATCGCCGTATTCTGGATGGCATG TTCGCCATTTGTGGTGTTAGCGATAGCAAATTCCGTACAATC TGCTCTAGCGTGGACAAACTGGACAAAGTGAGCTGGGAAGA GGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAGGCCTGGCTCCTG AAGTTGCCGACCGTATCGGAGATTATGTTCAGCAGCATGGC GGAGTTTCACTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCCGAAACT GTCTCAGAACAAACAGGCACTGGAAGGTCTGGGAGATCTGA AACTGCTGTTCGAGTATCTGACGCTGTTCGGTATTGACGACA AAATTTCCTTCGACCTGTCGCTGGCACGTGGTCTGGATTATT ATACAGGCGTGATCTATGAGGCTGTACTGCTGCAGACACCA GCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTTGGTTCAGTTGC	34

【表Ｄ９－６】

		TGCCGGTGGACGTTATGACGGACTGGTAGGGATGTTTGACC CAAAAGGCCGTAAAGTCCCGTGTGTAGGACTGTCTATTGGC GTTGAGCGTATCTTTAGCATCGTGGAGCAACGTCTGGAAGCT CTGGAGGAGAAAATCCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGT TGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAAC TGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTG CTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTA TTGTGAGGAAGCGGGTATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGA ACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGA CCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCGCCGTGAAGATCTGGTCG AGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	10
HisRS1^{C5}	1-174 + 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTCGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGAAACCCTGATGGGCAAATATGGGGAAGAT TCCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAGGGAGGTGAACT GCTGTCTCTGCGCTATGACCTGACTGTTCCTTTTGCTCGCTAT CTGGCCATGAATAAACTGACCAACATCAAACGCTATCATAT CGCCAAAGTGTATCGCCGTGACAATCCAGCAATGACCCGTG GTCGTTATCGTGAATTTTATCAGTGTGTGAACGATCGCCGTA TTCTGGACGGCATGTTCGCCATTTGTGGTGTGTCTGACTCCA AATTTCGTACGATCTGCTCAAGCGTGGACAAACTGGACAAA GTGAGCTGGGAAGAGGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGA AAGGCCTGGCTCCTGAAGTTGCCGACCGTATCGGAGATTAT GTTCAGCAGCATGGCGGAGTTTCACTGGTTGAACAACTGCTG CAAGACCCGAAACTGTCACAGAACAAACAGGCACTGGAAG GTCTGGGGGATCTGAAACTGCTGTTCGAGTATCTGACGCTGT TCGGTATTGACGACAAAATCAGCTTCGATCTGAGCCTGGCAC GTGGTCTGGACTATTATACCGGCGTGATTTATGAAGCCGTTC TGCTGCAGACTCCAGCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGT GTTGGAAGTGTGGCAGCCGGTGGCCGTTATGATGGTCTGGTT GGCATGTTTGACCCGAAAGGCCGTAAAGTCCCGTGTGTAGG ACTGTCTATCGGCGTGGAGCGTATTTTTAGCATCGTGGAACA ACGCCTGGAAGCTCTGGAAGAGAAAATCCGTACCACCGAAA CCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAA GAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCAT TAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGA ATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTCCTCTGGTGG CCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAAA CTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCGCCGT GAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACC TCTGTGTATTTGC	35
HisRS1^{C6}	1-60 + 101- 509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGAAACCCTGATGGGCAAATATGGCG AAGATTCCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAAGGCGGT GAACTGCTGTCCCTGCGTTATGACCTGACTGTTCCGTTTGCT CGTTATCTGGCCATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTAT CACATTGCCAAAGTGTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACT CGTGGACGTTATCGTGAATTCTATCAGTGTGACTTCGATATT GCCGGCAACTTCGACCCTATGATTCCGGATGCTGAATGCCTG AAAATCATGTGTGAGATCCTGAGCAGCCTGCAAATTGGTGA CTTCCTGGTGAAAGTGAATGACCGTCGTATCCTGGATGGCAT GTTCGCCATTTGTGGTGTTAGCGATTCCAAATTCCGTACCAT	36

【表Ｄ９－７】

		CTGTAGTAGTGTGGACAAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAAG AGGTGAAAAACGAAATGGTGGGCGAAAAAGGTCTGGCACCT GAGGTTGCTGATCGTATCGGTGACTATGTCCAGCAGCATGG AGGTGTTTCACTGGTTGAGCAACTGCTGCAAGATCCGAAACT GTCTCAGAACAAACAGGCCCTGGAAGGACTGGGTGATCTGA AACTGCTGTTCGAGTATCTGACGCTGTTCGGTATTGATGACA AAATCTCGTTCGACCTGTCTCTGGCTCGTGGACTGGATTATT ATACGGGCGTAATCTATGAAGCTGTCCTGCTGCAGACACCA GCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTTGGAAGTGTTGC TGCCGGTGGTCGCTATGACGGACTGGTTGGCATGTTCGATCC GAAAGGCCGTAAAGTTCCGTGTGTAGGACTGAGCATTGGCG TTGAGCGTATCTTTTCCATCGTTGAGCAACGTCTGGAAGCAC TGGAAGAGAAAATCCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTT GCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACT GGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGC TGTATAAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTAT TGTGAGGAAGCGGGTATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGA ACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGA CCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCGCCGTGAAGATCTGGTCG AGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	10
HisRS1^{C7}	1-100＋ 175-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTCGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGATTTCGATATTGCCGGCAACTTTGATCCGA TGATTCCGGATGCTGAGTGTCTGAAAATCATGTGTGAGATCC TGAGTAGTCTGCAGATTGGGGATTTCCTGGTGAAAGTGAAC GATCGCCGTATTCTGGACGGCATGTTTGCCATTTGTGGCGTT AGCGATAGCAAATTCCGTACGATCTGTAGCAGTGTGGACAA ACTGGATAAAGTCTCTTGGGAAGAGGTCAAAAACGAGATGG TTGGTGAGAAAGGCCTGGCTCCTGAAGTGGCTGACCGTATT GGTGATTATGTCCAGCAGCATGGTGGTGTTTCACTGGTTGAA CAACTGCTGCAAGACCCGAAACTGTCTCAGAACAAACAGGC ACTGGAAGGTCTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTCGAGTATCT GACGCTGTTCGGTATTGACGACAAAATTTCCTTCGACCTGTC ACTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACAGGCGTAATCTATGA GGCTGTACTGCTGCAAACTCCAGCACAAGCAGGTGAAGAAC CTCTGGGAGTTGGTAGTGTAGCGGCAGGGGGTCGTTATGAT GGGCTGGTCGGGATGTTCGATCCAAAAGGCCGTAAAGTCCC GTGTGTTGGTCTGTCTATTGGCGTTGAGCGTATCTTCTCCATC GTGGAGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAAGAAAAAATCCGTAC CACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAAC TGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGAT GCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAA ACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTC CTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGGC GTTATTAAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGAC GTTCGCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTAC CGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	37
HisRS1^{C10}	369-509	ATGTTCGACCCAAAAGGCCGTAAAGTTCCGTGTGTAGGGCT GTCTATCGGTGTTGAGCGTATCTTCTCCATCGTTGAGCAGCG TCTGGAAGCACTGGAGGAAAAAATCCGTACGACCGAGACTC AAGTCCTGGTTGCTAGTGCCCAGAAAAAACTGCTGGAAGAG CGCCTGAAACTGGTTAGTGAGCTGTGGGATGCCGGTATTAA AGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATC AGCTGCAGTATTGTGAAGAAGCGGGCATTCCGCTGGTAGCG ATTATCGGGGAACAAGAACTGAAAGATGGCGTGATCAAACT	38

【表Ｄ９－８】

		GCGTAGCGTTACAAGCCGTGAGGAAGTGGACGTCCGCCGTG AGGATCTGGTTGAAGAGATTAAACGCCGTACAGGTCAGCCT CTGTGTATTTGC	

【０４１１】

追加のコード配列または非コード配列が、本発明のポリヌクレオチドの中に存在していてもよいが、存在している必要はなく、ポリヌクレオチドは、他の分子および／または支持材料に連結されていてもよいが、連結されている必要はない。したがって、本発明のポリヌクレオチドは、コード配列自体の長さにかかわらず、例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナルを含めた発現コントロール配列などの他のＤＮＡまたはＲＮＡ配列と組み合わせ、これらに作動可能にカップリングすることができる。さらに、ポリヌクレオチドは、制限酵素部位、複数のクローニング部位、他のコードセグメントなどをさらに含むことができ、その結果、これらの全体長は、相当に変化し得る。

【０４１２】

したがって、ほとんど任意の長さのポリヌクレオチド断片を使用することができ、合計長は、意図された組換えＤＮＡプロトコールにおける調製および使用の容易さによって好ましくは制限されることが企図されている。長さが約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４１、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２４０、２６０、２７０、２８０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２７００、２８００、２９００、３０００またはそれ以上（間のすべての整数を含む）の塩基のポリヌクレオチドが、ＨＲＳ参照ポリヌクレオチド（例えば、塩基数Ｘ－Ｙ（式中、Ｘは約１～３０００以上、Ｙは約１０～３０００以上である））の任意の部分もしくは断片（例えば、長さが約６、７、８、９、もしくは１０ヌクレオチド超）、またはその補体を含めて、含まれる。

【０４１３】

本発明の実施形態は、ＨＲＳポリペプチドコード参照ポリヌクレオチド配列の「バリアント」も含む。ポリヌクレオチド「バリアント」は、参照ポリヌクレオチドに関して、１つまたは複数の置換、付加、欠失、および／または挿入を含有し得る。一般に、ＨＲＳポリペプチド参照ポリヌクレオチド配列のバリアントは、デフォルトのパラメータを使用して、本明細書の他で記載した配列整列プログラムによって判定した場合、その特定のヌクレオチド配列（例えば、配列番号２４～３８、４０、４２、７２～７３、１７３～１７５、または１８３～１８９など）と少なくとも約３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、一般に、少なくとも約７５％、８０％、８５％、望ましくは約９０％～９５％、またはそれ以上、より適切には約９８％、またはそれ以上の配列同一性を有し得る。ある特定の実施形態では、バリアントは、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４１、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、６０、７０、８０、９０、１００（間のすべての整数を含む）、またはそれ以上の塩基によって参照配列と異なる場合がある。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドバリアントが非カノニカル活性を有するＨＲＳポリペプチドをコードする際などに、コードされるＨＲＳポリペプチドの所望の活性は、無修飾ポリペプチドと比べて実質的に減少されない。コードされるポリペプチドの活性に対する効果は、一般に、例えば、本明細書に記載の方法を含めて、本明細書に記載されるように評価することができる。いくつか

の実施形態では、バリアントは、例えば、主にモノマー、二量体、または多量体として異なる実施形態において存在するＨＲＳポリペプチドを提供するために、ＨＲＳポリペプチドの凝集状態を変更することができる。

【０４１４】

ある特定の実施形態は、以下に記載されるストリンジェンシー条件下で、参照ＨＲＳポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号２４～３８、４０、４２、７２～７３、１７３～１７５、もしくは１８３～１８９のいずれかなど）、またはこれらの補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。本明細書において使用する場合、用語「低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての条件を記述する。ハイブリダイゼーション反応を実施するためのガイダンスは、Ausubelら、（１９９８年、上記）、セクション６．３．１～６．３．６に見つけることができる。水性および非水性方法がその参考文献に記載されており、いずれも使用することができる。

【０４１５】

低ストリンジェンシー条件への本明細書での言及は、４２℃でのハイブリダイゼーションについて少なくとも約１％ｖ／ｖ～少なくとも約１５％ｖ／ｖのホルムアミド、および少なくとも約１Ｍ～少なくとも約２Ｍの塩、ならびに４２℃での洗浄について少なくとも約１Ｍ～少なくとも約２Ｍの塩を含み、包含する。低ストリンジェンシー条件はまた、６５℃でのハイブリダイゼーションについて、１％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．５ＭのＮａＨＰＯ$_4$（ｐＨ７．２）、７％のＳＤＳ、および室温での洗浄について（ｉ）２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ；または（ｉｉ）０．５％のＢＳＡ、１ｍＭのＥＤＴＡ、４０ｍＭのＮａＨＰＯ$_4$（ｐＨ７．２）、５％のＳＤＳを含み得る。低ストリンジェンシー条件の一実施形態は、約４５℃で６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中のハイブリダイゼーション、その後の少なくとも５０℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ中の２回の洗浄を含む（洗浄の温度は、低ストリンジェンシー条件については５５℃まで上げることができる）。

【０４１６】

中ストリンジェンシー条件は、４２℃でのハイブリダイゼーションについて、少なくとも約１６％ｖ／ｖ～少なくとも約３０％ｖ／ｖのホルムアミド、および少なくとも約０．５Ｍ～少なくとも約０．９Ｍの塩、ならびに５５℃での洗浄について少なくとも約０．１Ｍ～少なくとも約０．２Ｍの塩を含み、包含する。中ストリンジェンシー条件はまた、６５℃でのハイブリダイゼーションについて、１％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．５ＭのＮａＨＰＯ$_4$（ｐＨ７．２）、７％のＳＤＳ、および６０～６５℃での洗浄について、（ｉ）２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ、または（ｉｉ）０．５％のＢＳＡ、１ｍＭのＥＤＴＡ、４０ｍＭのＮａＨＰＯ$_4$（ｐＨ７．２）、５％のＳＤＳを含み得る。中ストリンジェンシー条件の一実施形態は、約４５℃で６×ＳＳＣ中のハイブリダイジング、その後の６０℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ中の１回または複数の洗浄を含む。高ストリンジェンシー条件は、４２℃でのハイブリダイゼーションについて、少なくとも約３１％ｖ／ｖ～少なくとも約５０％ｖ／ｖのホルムアミド、および約０．０１Ｍ～約０．１５Ｍの塩、ならびに５５℃での洗浄について、約０．０１Ｍ～約０．０２Ｍの塩を含み、包含する。

【０４１７】

高ストリンジェンシー条件はまた、６５℃でのハイブリダイゼーションについて、１％のＢＳＡ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．５ＭのＮａＨＰＯ$_4$（ｐＨ７．２）、７％のＳＤＳ、および６５℃を超える温度での洗浄について、（ｉ）０．２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ、または（ｉｉ）０．５％のＢＳＡ、１ｍＭのＥＤＴＡ、４０ｍＭのＮａＨＰＯ$_4$（ｐＨ７．２）、１％のＳＤＳを含み得る。高ストリンジェンシー条件の一実施形態は、約４５℃で６×ＳＳＣ中のハイブリダイジング、その後の６５℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ中の１回または複数の洗浄を含む。非常に高いストリンジェンシー条件の一実施形

態は、６５℃で０．５Ｍのリン酸ナトリウム、７％のＳＤＳ中のハイブリダイジング、その後の６５℃で０．２×ＳＳＣ、１％のＳＤＳ中の１回または複数の洗浄を含む。

【０４１８】

他のストリンジェンシー条件は、当技術分野で周知であり、当業者は、ハイブリダイゼーションの特異性を最適化するのに様々な要因をマニピュレートすることができることを認識する。最終洗浄のストリンジェンシーを最適化すると、高い程度のハイブリダイゼーションを保証する機能を果たすことができる。詳細な例については、２．１０．１～２．１０．１６頁のAusubelら、上記、およびセクション１．１０１～１．１０４のSambrookら（１９８９年、上記）を参照。ストリンジェントな洗浄は一般に、約４２℃～６８℃の温度で実施されるが、当業者は、他の温度もストリンジェントな条件に適当であり得ることを認める。最大ハイブリダイゼーション率は一般に、ＤＮＡ－ＤＮＡハイブリッドの形成について、T_mの約２０℃～２５℃下で起こる。T_mは、融解温度、または２つの相補的なポリヌクレオチド配列が解離する温度であることは、当技術分野で周知である。T_mを推定するための方法が、当技術分野で周知である（２．１０．８頁のAusubelら、上記を参照）。

【０４１９】

一般に、ＤＮＡの完全にマッチしたデュプレックスのT_mは、式：T_m＝８１．５＋１６．６（$\log_{10}$Ｍ）＋０．４１（％Ｇ＋Ｃ）－０．６３（％ホルムアミド）－（６００／長さ）による近似として予測することができ、式中、Ｍは、好ましくは、０．０１モル～０．４モルの範囲内のNa^+の濃度であり；％Ｇ＋Ｃは、３０％～７５％の間のＧ＋Ｃの範囲内の塩基の総数のパーセンテージとしてのグアノシン塩基とシトシン塩基の和であり；％ホルムアミドは、体積によるパーセントホルムアミド濃度であり；長さは、ＤＮＡデュプレックス中の塩基対の数である。デュプレックスＤＮＡのT_mは、ランダムにミスマッチした塩基対の数が１％増加するごとにおよそ１℃減少する。洗浄は一般に、高ストリンジェンシーについてT_m－１５℃、または中ストリンジェンシーについてT_m－３０℃で実施される。

【０４２０】

ハイブリダイゼーション手順の一例では、固定化されたＤＮＡを含有する膜（例えば、ニトロセルロース膜またはナイロン膜）が、標識プローブを含有するハイブリダイゼーション緩衝液（５０％の脱イオン化ホルムアミド、５×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液（０．１％のフィコール、０．１％のポリビニルピロリドン（polyvinylpyrollidone）、および０．１％のウシ血清アルブミン）、０．１％のＳＤＳ、ならびに２００ｍｇ／ｍＬの変性サケ精子ＤＮＡ）中で、４２℃で一晩ハイブリダイズされる。次いで膜は、２回の逐次の中ストリンジェンシー洗浄（即ち、４５℃で１５分間、２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ、その後、５０℃で１５分間、２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ）、その後、２回の逐次のより高いストリンジェンシー洗浄（即ち、５５℃で１２分間、０．２×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳ、その後、６５～６８℃で１２分間、０．２×ＳＳＣおよび０．１％のＳＤＳ溶液）にかけられる。

【０４２１】

ＨＲＳポリペプチドの生成

ＨＲＳポリペプチドは、当業者に公知の任意の適当な手順によって、例えば、標準的な固相ペプチド合成（Merrifield、J. Am. Chem. Soc.、８５巻：２１４９～２１５４頁（１９６３年））を使用することによって、または遺伝的に改変された宿主を使用する組換え技術によって調製することができる。タンパク質合成は、マニュアル技法を使用して、または自動化によって実施することができる。自動合成は、例えば、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ４３１Ａ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ）を使用して実現され得る。代わりに、様々な断片を別個に化学合成し、化学的方法を使用して組み合わせて、所望の分子を生成してもよい。

【０４２２】

ＨＲＳポリペプチドは、周知の技法によって、適当な宿主細胞内で対象のＨＲＳポリペ

プチドをコードするＤＮＡ配列を発現させることによって生成することもできる。ＨＲＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、確立された標準方法、例えば、Beaucageら（１９８１年）Tetrahedron Letters、２２巻：１８５９～１８６９頁によって記載されたホスホラミダイト法（phosphoamidite method）、またはMatthesら（１９８４年）EMBO Journal、３巻：８０１～８０５頁に記載された方法によって合成的に調製することができる。ホスホラミダイト法によれば、オリゴヌクレオチドは、例えば、自動ＤＮＡシンセサイザーで合成され、精製、デュプレックス化、およびライゲーションされて合成ＤＮＡコンストラクトが形成される。代わりに、ＤＮＡコンストラクトは、制限酵素媒介クローニングおよびＰＣＲベース遺伝子増幅を含む標準的な組換え分子生物学的技法を使用して構築することができる。

【０４２３】

ポリヌクレオチド配列は、混合されたゲノム、ｃＤＮＡ、および合成の起源のものである場合もある。例えば、リーダーペプチドをコードするゲノムまたはｃＤＮＡ配列を、ＨＲＳポリペプチドをコードするゲノムまたはｃＤＮＡ配列に繋ぐことができ、その後、ＤＮＡ配列を、所望のアミノ酸配列をコードする合成オリゴヌクレオチドを挿入することによって、または適当なオリゴヌクレオチドを使用してＰＣＲによって一部位で修飾することができる。いくつかの実施形態では、シグナル配列をコード配列の前に含めることができる。この配列は、ポリペプチドを細胞表面に向け、または媒質中にポリペプチドを分泌するように宿主細胞に伝達する、コード配列に対してＮ－末端のシグナルペプチドをコードする。一般に、シグナルペプチドは、タンパク質が細胞を出る前に宿主細胞によって切り取られる。シグナルペプチドは、原核生物および真核生物内の様々なタンパク質中に見つけることができる。

【０４２４】

様々な発現ベクター／宿主系が公知であり、ポリヌクレオチド配列を収容し、発現させるのに利用することができる。これらには、それだけに限らないが、組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；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；ウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウイルス、ＴＭＶ）または細菌発現ベクター（例えば、ＴｉもしくはｐＢＲ３２２プラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいはウイルス、プラスミド、エピソーム、または組込み発現ベクターで形質転換された、哺乳動物細胞を含めた動物細胞系、より具体的にはヒト細胞系が含まれる。

【０４２５】

このような発現ベクターは、例えば、エンハンサー、プロモーター、５’および３’非翻訳領域を含めた発現コントロール細胞を含むことができ、これらは、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写および翻訳を実施する。このようなエレメントは、その強度および特異性が多様となり得る。利用されるベクター系および宿主に応じて、構成的プロモーターおよび誘導プロモーターを含めた任意の数の適当な転写および翻訳エレメントを使用することができる。例えば、細菌系内でクローニングするとき、誘導プロモーター、例えば、ＰＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴファージミドのハイブリッドｌａｃＺプロモーター（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆ．）、またはＰＳＰＯＲＴ１プラスミド（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、Ｍｄ．）などを使用することができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターが一般に好適である。ポリペプチドをコードする配列の多数のコピーを含有する細胞系統を生成する必要がある場合、ＳＶ４０またはＥＢＶに基づくベクターを、有利には、適切な選択可能マーカーとともに使用することができる。

【０４２６】

ある特定の実施形態は、Ｅ．ｃｏｌｉベース発現系を使用することができる（例えば、Structural Genomics Consortiumら、Nature Methods.、５巻：１３５～１４６頁、２００８年を参照）。これらの実施形態および関連実施形態は、適当な発現ベクターを生成

するのに、ライゲーション非依存性クローニング（ＬＩＣ）を部分的または完全に利用することができる。特定の実施形態では、タンパク質発現は、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ（例えば、ｐＥＴベクターシリーズ）によってコントロールすることができる。これらの実施形態および関連実施形態は、標的タンパク質安定性の改善のために、発現宿主株ＢＬ２１（ＤＥ３）、Ｔ７媒介発現を支持し、ｌｏｎおよびｏｍｐＴプロテアーゼが不足しているＢＬ２１のλＤＥ３リソゲンを利用することができる。Ｅ．ｃｏｌｉ内でまれに使用される、ｔＲＮＡをコードするプラスミドを担持する発現宿主株、例えば、ＲＯＳＥＴＴＡ（商標）（ＤＥ３）およびＲｏｓｅｔｔａ２（ＤＥ３）株なども含まれる。いくつかの実施形態では、Ｗ３１１０（Ｆ－ラムダ－ＩＮ（ｒｒｎＤ－ｒｒｎＥ）１　ｒｐｈ－１）などの他のＥ．ｃｏｌｉ　Ｋ－１２株を含めた他のＥ．ｃｏｌｉ株を利用することができ、これらは、発酵の間、翻訳後修飾のレベルを低減することができる。細胞溶解および試料の取り扱いも、商標ＢＥＮＺＯＮＡＳＥ（登録商標）ヌクレアーゼおよびＢＵＧＢＵＳＴＥＲ（登録商標）タンパク質抽出試薬の下で販売されている試薬を使用して改善することができる。細胞培養に関して、自己誘導培地は、ハイスループット発現系を含めた多くの発現系の効率を改善することができる。このタイプの培地（例えば、ＯＶＥＲＮＩＧＨＴ　ＥＸＰＲＥＳＳ（商標）自己誘導システム）は、ＩＰＴＧなどの人工誘導剤を添加することなく、代謝シフトによってタンパク質発現を徐々に誘発する。

【０４２７】

特定の実施形態は、ヘキサヒスチジンタグ、または他の親和性タグもしくは精製タグ、その後、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）精製、または関連技法を使用する。しかし、ある特定の態様では、臨床グレードタンパク質を、親和性タグの使用の有無にかかわらず、Ｅ．ｃｏｌｉ封入体から単離することができる（例えば、Shimpら、Protein Expr Purif.、５０巻：５８～６７号、２００６年を参照）。さらなる例として、ある特定の実施形態は、コールドショック誘導性Ｅ．ｃｏｌｉ高収率生産システムを使用することができ、その理由は、低温で、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ内でタンパク質を過剰発現させると、これらの溶解度および安定性が改善されるためである（例えば、Qingら、Nature Biotechnology.、２２巻：８７７～８８２頁、２００４年を参照）。

【０４２８】

高密度細菌発酵系も含まれる。例えば、Ｒａｌｓｔｏｎｉａ　ｅｕｔｒｏｐｈａの高細胞密度培養は、１５０ｇ／Ｌを超える細胞密度でのタンパク質産生、および１０ｇ／Ｌを超える力価での組換えタンパク質の発現を可能にする。酵母Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅでは、構成的プロモーターまたは誘導プロモーター、例えば、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、およびＰＧＨなどを含有するいくつかのベクターを使用することができる。総説に関して、Ausubelら（上記）およびGrantら、Methods Enzymol.、１５３巻：５１６～５４４頁（１９８７年）を参照。Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｎｄｏｒｉｓ発現系も含まれる（例えば、Liら、Nature Biotechnology.、２４巻、２１０～２１５頁、２００６年；およびHamiltonら、Science、３０１巻：１２４４頁、２００３年を参照）。ある特定の実施形態は、とりわけ、ヒト化Ｎ－グリコシル化経路を有する酵母を含めた、タンパク質を選択的にグリコシル化するように操作された酵母系を含む（例えば、Hamiltonら、Science.、３１３巻：１４４１～１４４３頁、２００６年；Wildtら、Nature Reviews Microbiol.、３巻：１１９～２８頁、２００５年；およびGerngrossら、Nature-Biotechnology.、２２巻：１４０９～１４１４頁、２００４年；米国特許第７，６２９，１６３号；同第７，３２６，６８１号；および同第７，０２９，８７２号を参照）。単に例として、組換え酵母培養物は、とりわけ、フェルンバッハフラスコ、または１５Ｌ、５０Ｌ、１００Ｌ、および２００Ｌの発酵槽内で増殖させることができる。

【０４２９】

植物発現ベクターが使用される場合では、ポリペプチドをコードする配列の発現は、いくつかのプロモーターのいずれかによって推進され得る。例えば、ウイルスプロモーター、例えば、ＣａＭＶの３５Ｓおよび１９Ｓプロモーターなどを、単独で、またはＴＭＶ由

来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用することができる（Takamatsu、EMBO J.、６巻：３０７～３１１頁（１９８７年））。代わりに、植物プロモーター、例えば、ＲＵＢＩＳＣＯの小サブユニットまたは熱ショックプロモーターなどを使用することができる（Coruzziら、EMBO J.、３巻：１６７１～１６８０頁（１９８４年）；Broglieら、Science、２２４巻：８３８～８４３頁（１９８４年）；およびWinterら、Results Probl. Cell Differ.、１７巻：８５～１０５頁（１９９１年））。これらのコンストラクトは、直接のＤＮＡ形質転換または病原体媒介トランスフェクションによって植物細胞内に導入することができる。このような技法は、いくつかの一般に利用可能な総説に記載されている（例えば、McGraw Hill、Yearbook of Science and Technology、１９１～１９６頁（１９９２年）におけるHobbsを参照）。

【０４３０】

昆虫系も、目的のポリペプチドを発現させるのに使用することができる。例えば、１つのこのような系では、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多角体病ウイルス（ＡｃＮＰＶ）が、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞内またはトリコプルシア細胞内で異種遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。ポリペプチドをコードする配列は、ポリヘドリン遺伝子などのウイルスの非本質的な領域中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターのコントロール下で配置することができる。ポリペプチドコード配列の挿入に成功すると、ポリヘドリン遺伝子が不活性になり、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが産生されることになる。次いで組換えウイルスを、例えば、目的のポリペプチドが発現され得るＳ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞またはトリコプルシア細胞を感染させるのに使用することができる（Engelhardら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、９１巻：３２２４～３２２７号（１９９４年））。ＳＦ９、ＳＦ２１、およびＴ．ｎｉ細胞を利用するものを含めたバキュロウイルス発現系も含まれる（例えば、MurphyおよびPiwnica-Worms、Curr Protoc Protein Sci.、５章：ユニット５．４、２００１年を参照）。昆虫系は、哺乳動物系と同様である翻訳後修飾をもたらすことができる。

【０４３１】

哺乳動物宿主細胞では、いくつかの発現系が当技術分野で周知であり、市販されている。例示的な哺乳動物ベクター系としては、例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製のｐＣＥＰ４、ｐＲＥＰ４、およびｐＲＥＰ７、Ｃｒｕｃｅｌｌ製のＰｅｒＣ６系、ならびにＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製のｐＬＰ１などのレンチウイルスベース系などがある。例えば、アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合では、目的のポリペプチドをコードする配列を、後期プロモーターおよびトリパータイトリーダー配列からなるアデノウイルス転写／翻訳複合体中にライゲーションすることができる。ウイルスゲノムの非本質的なＥ１またはＥ３領域中の挿入を使用して、感染した宿主細胞内でポリペプチドを発現させることができる生存ウイルスを得ることができる（Logan & Shenk、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、８１巻：３６５５～３６５９、１９８４年）。さらに、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）エンハンサーなどの転写エンハンサーを使用して、哺乳動物宿主細胞内の発現を増大させることができる。

【０４３２】

有用な哺乳動物宿主細胞系統の例としては、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１系統（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）；ヒト胚腎臓系統（懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた２９３または２９３細胞、Grahamら、J. Gen Virol.、３６巻：５９頁（１９７７年））；仔ハムスター腎細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ １０）；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Mather、Biol. Reprod.、２３巻：２４３～２５１頁（１９８０年））；サル腎細胞（ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７０）；アフリカミドリザル腎細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ２）；イヌ腎細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ３４）；バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ３Ａ、ＡＴＣＣ ＣＲＬ１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ Ｇ２、ＨＢ ８０６５

）；マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；ＴＲ１細胞（Matherら、Annals N.Y. Acad. Sci.、３８３巻：４４～６８頁（１９８２年））；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；およびヒト肝細胞癌系統（Ｈｅｐ　Ｇ２）がある。他の有用な哺乳動物宿主細胞系統としては、ＤＨＦＲ－ＣＨＯ細胞（Urlaubら、PNAS USA、７７巻：４２１６頁（１９８０年））を含めたチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞；ならびに骨髄腫細胞系統、例えば、ＮＳＯおよびＳｐ２／０などがある。抗体産生に適したある特定の哺乳動物宿主細胞系統の総説については、例えば、YazakiおよびWu、Methods in Molecular Biology、２４８巻（B.K.C Lo編、Humana Press、Totowa、N.J.、２００３年）、２５５～２６８頁を参照。ある特定の好適な哺乳動物細胞発現系には、ＣＨＯおよびＨＥＫ２９３細胞ベース発現系が含まれる。哺乳動物発現系は、当技術分野で公知のものの中でも、例えば、Ｔ－フラスコ、ローラーボトル、もしくは細胞ファクトリー、または懸濁培養内で、例えば、１Ｌおよび５Ｌのスピナー、５Ｌ、１４Ｌ、４０Ｌ、１００Ｌ、および２００Ｌの撹拌タンクバイオリアクター、または２０／５０Ｌおよび１００／２００ＬのＷＡＶＥバイオリアクター内で、付着した細胞系統を利用することができる。

【０４３３】

無細胞タンパク質発現の方法も含まれる。これらの実施形態および関連実施形態は一般に、精製されたＲＮＡポリメラーゼ、リボソーム、ｔＲＮＡ、およびリボヌクレオチドを利用する。このような試薬は、例えば、細胞、または細胞ベース発現系からの抽出によって生成することができる。

【０４３４】

さらに、宿主細胞株は、所望の様式で挿入された配列の発現を調節し、または発現タンパク質をプロセシングするその能力について選択することができる。ポリペプチドのこのような修飾としては、それだけに限らないが、翻訳後修飾、例えば、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、およびアシル化など、または天然に存在しないアミノ酸の挿入がある（一般に、米国特許第ＵＳ７，９３９，４９６号；同第ＵＳ７，８１６，３２０号；同第ＵＳ７，９４７，４７３号；同第ＵＳ７，８８３，８６６号；同第ＵＳ７８３８，２６５号；同第ＵＳ７，８２９，３１０号；同第ＵＳ７，８２０，７６６号；同第ＵＳ７，８２０，７６６号；同第ＵＳ７，７７３７，２２６号、同第ＵＳ７，７３６，８７２号；同第ＵＳ７，６３８，２９９号；同第ＵＳ７，６３２，９２４号；および同第ＵＳ７，２３０，０６８号を参照）。タンパク質の「プレプロ」型を切断する翻訳後プロセシングも、正確な挿入、フォールディング、および／または機能を促進するために使用することができる。細菌細胞に加えて、このような翻訳後活性のための特定の細胞マシーナリーおよび特徴的な機構を有し、またはそれどころかこれらを欠く異なる宿主細胞、例えば、酵母、ＣＨＯ、ＨｅＬａ、ＭＤＣＫ、ＨＥＫ２９３、およびＷ１３８などを選択して、異種タンパク質の正確な修飾およびプロセシングを保証することができる。

【０４３５】

組換え細胞によって産生されるＨＲＳポリペプチドは、当技術分野で公知の様々な技法によって精製し、特徴付けることができる。タンパク質精製を実施し、タンパク質純度を分析するための例示的なシステムとしては、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）（例えば、ＡＫＴＡおよびＢｉｏ－Ｒａｄ　ＦＰＬＣシステム）、高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）（例えば、Ｂｅｃｋｍａｎ　ａｎｄ　Ｗａｔｅｒｓ　ＨＰＬＣ）がある。精製のための例示的な化学としては、当技術分野で公知のものの中でも、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、Ｑ、Ｓ）、サイズ排除クロマトグラフィー、塩勾配、親和性精製（例えば、Ｎｉ、Ｃｏ、ＦＬＡＧ、マルトース、グルタチオン、プロテインＡ／Ｇ）、ゲル濾過、逆相、セラミックＨＹＰＥＲＤ（登録商標）イオン交換クロマトグラフィー、および疎水性相互作用カラム（ＨＩＣ）がある。いくつかの例示的な方法は、実施例のセクションでも開示されている。

【０４３６】

組換えベクターおよびポリヌクレオチド

本発明の別の実施形態は、配列が本明細書に開示のＨＲＳポリペプチドのいずれかをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む組換えポリヌクレオチド、組換えベクター、および組換えウイルスベクターを提供する。

【０４３７】

ＨＲＳポリペプチドであって、これらが導入される細胞の集団の先天的な免疫活性を低減することができ、したがって、その細胞集団内でのタンパク質産生の効率を増大させる、ＨＲＳポリペプチドをコードする修飾された、および増強されたｍＲＮＡを含む製剤も含まれる。このような修飾されたｍＲＮＡは、例えば、５’Ｃａｐ１構造および長さがおよそ１６０ヌクレオチドのｐｏｌｙＡ末端を含み、これらは、例えば、その内容全体が参照により組み込まれている、米国出願公開第２０１２／０２５１６１８号、ならびに国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０４６８６１号および同第ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０５４６３６号に記載されているように、脂質製剤、例えば、リポソーム、リポプレックス（lipoplexe）または脂質ナノ粒子などで、必要に応じて製剤化される。

【０４３８】

本発明のＨＲＳポリペプチドを発現させるのに適した組換えベクターの選択、ＨＲＳポリペプチドを発現させるための核酸配列をベクター中に挿入するための方法、および組換えベクターを目的の細胞に送達する方法は、当技術分野の技術範囲内である。例えば、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれている、Tuschl, T.（２００２年）、Nat. Biotechnol、２０巻：４４６～４４８頁；Brummelkamp T Rら（２００２年）、Science、２９６巻：５５０～５５３頁；Miyagishi Mら（２００２年）、Nat. Biotechnol.、２０巻：４９７～５００頁；Paddison P Jら（２００２年）、Genes Dev.、１６巻：９４８～９５８頁；Lee N Sら（２００２年）、Nat. Biotechnol.、２０巻：５００～５０５頁；Paul C Pら（２００２年）、Nat. Biotechnol.、２０巻：５０５～５０８頁、Coneseら、Gene Therapy、１１巻：１７３５～１７４２頁（２００４年）、およびFjord-Larsenら、（２００５年）Exp Neurol、１９５巻：４９～６０頁を参照。

【０４３９】

代表的な市販の組換え発現ベクターとしては、例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製のｐＲＥＰ４、ｐＣＥＰ４、ｐＲＥＰ７、およびｐｃＤＮＡ３．１、およびｐｃＤＮＡ（商標）５／ＦＲＴ、ならびにＳｔｒａｔａｇｅｎｅ製のｐＢＫ－ＣＭＶおよびｐＥｘｃｈａｎｇｅ－６ Ｃｏｒｅ Ｖｅｃｔｏｒｓがある。代表的な市販のウイルス発現ベクターとしては、それだけに限らないが、Ｃｒｕｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．から入手可能なＰｅｒ．Ｃ６システムなどのアデノウイルスベースシステム、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製のｐＬＰ１などのレンチウイルスベースシステム、ならびにレトロウイルスベクター、例えば、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（ＵＳ）製のレトロウイルスベクターｐＦＢ－ＥＲＶおよびｐＣＦＢ－ＥＧＳＨなどがある。

【０４４０】

一般に、ＨＲＳポリペプチドのコード配列を受け入れることができる任意の組換えまたはウイルスベクター、例えば、アデノウイルス（ＡＶ）；アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）；レトロウイルス（例えば、レンチウイルス（ＬＶ）、ラブドウイルス、マウス白血病ウイルス）；ヘルペスウイルス、パピローマウイルス（米国特許第６，３９９，３８３号＆同第７，２０５，１２６号）などに由来するベクターを使用することができる。ウイルスベクターの向性は、他のウイルスに由来するエンベロープタンパク質または他の表面抗原を用いてベクターをシュードタイピングすることによって修飾することもできる。例えば、本発明のＡＡＶベクターは、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）、狂犬病、エボラ、モコラなどに由来する表面タンパク質を用いてシュードタイピングすることができる。例えば、パピローマウイルスの非感染性偽ウイルスも、遺伝子の粘膜への効率的な送達を可能にするのに使用することができる（米国特許第７，２０５，１２６号、Pengら、Gene Ther.、２０１０年７月２９日の電子出版）。

【０４４１】

いくつかの態様では、ＡＶおよびＡＡＶに由来するウイルスベクターを、本発明で使用することができる。本発明のＨＲＳポリペプチドを発現させるのに適したＡＡＶベクター、組換えＡＡＶベクターを構築するための方法、およびベクターを標的細胞内に送達するための方法は、Samulski Rら（１９８７年）、J. Virol.、６１巻：３０９６～３１０１頁；Fisher K Jら（１９９６年）、J. Virol.、７０巻：５２０～５３２頁；Samulski Rら（１９８９年）、J. Virol.、６３巻：３８２２～３８２６頁；米国特許第５，２５２，４７９号；米国特許第５，１３９，９４１号；国際特許出願第ＷＯ９４／１３７８８号；および国際特許出願第ＷＯ９３／２４６４１号に記載されており、これらの開示全体は、参照により本明細書に組み込まれている。

【０４４２】

一般に、組換えベクターおよび組換えウイルスベクターは、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏの両方で、様々な系内で本発明のポリヌクレオチドの発現を指示する発現コントロール配列を含む。例えば、一セットの制御エレメントは、ある特定の哺乳動物細胞または組織内の発現を指示し、別のセットの制御エレメントは、細菌性細胞に発現を指示し、さらに第３のセットの制御エレメントは、バキュロウイルス系内の発現を指示する。いくつかのベクターは、１つを超える系内の発現に必要な制御エレメントを含有するハイブリッドベクターである。これらの様々な制御系を含有するベクターは、市販されており、当業者は、本発明のポリヌクレオチドをこのようなベクター中に容易にクローニングすることができる。

【０４４３】

場合によっては、ポリヌクレオチドまたはベクターは、多種多様な細胞内でＨＲＳポリペプチドを発現するためのプロモーターを有することになる。他の例では、ベクターは、組織特異的であるプロモーターを持つことになる。例えば、プロモーターは、免疫細胞、筋細胞内でのみ発現を指示する。いくつかの態様では、本発明のベクターは、ヌクレオチド配列が配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、または１７６～１８２のいずれかのＨＲＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【０４４４】

組換えポリヌクレオチドおよびベクターは、またはＭｉｎｉｓ Ｔｒａｎｓｉｔ ＬＴ１親油性試薬；リポフェクチン；リポフェクタミン；セルフェクチン；ポリカチオン（例えば、ポリリシン）、もしくはリポソームを含めた適当なデリバリー試薬と併せて患者に直接投与することができる。本発明で使用するのに適した組換えウイルスベクターの選択、ＨＲＳポリペプチドを発現させるための核酸配列をベクター中に挿入するための方法、およびウイルスベクターを目的の細胞に送達する方法は、当技術分野の技術範囲内である。例えば、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれている、Dornburg R（１９９５年）、Gene Therap.、２巻：３０１～３１０頁；Eglitis M A（１９８８年）、Biotechniques、６巻：６０８～６１４頁；Miller A D（１９９０年）、Hum Gene Therap.、１巻：５～１４頁；およびAnderson W F（１９９８年）、Nature、３９２巻：２５～３０頁を参照。

【０４４５】

宿主細胞

いくつかの実施形態は、本明細書に記載のベクターまたはポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞を含む。いくつかの態様では、本明細書に記載のＨＲＳポリペプチドは、ＨＲＳポリペプチドを生成または製造するために、宿主細胞によって発現される。このような宿主細胞としては、細菌、昆虫細胞、酵母細胞、および哺乳動物細胞がある。

【０４４６】

いくつかの態様では、細胞療法を介してＨＲＳポリペプチドを発現させ、送達するために宿主細胞を使用することができる。したがって、ある特定の態様は、自己免疫性または炎症性の疾患または障害を処置するための細胞療法であって、本発明のＨＲＳポリペプチドを発現する、または発現することができる宿主細胞を投与するステップを含む、細胞療

法を含む。いくつかの態様では、疾患または障害は、例えば、本明細書に記載のものの中でも、多発性筋炎、皮膚筋炎、多発性筋炎－強皮症オーバーラップ、間質性肺疾患、過敏性肺炎、強皮症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、チャーグ－ストラウス症候群、ウェジナー肉芽腫症、グッドパスチャー症候群、喘息、筋ジストロフィー、悪液質、および横紋筋融解症を含めた炎症性筋疾患から選択される。

【０４４７】

細胞療法では、体外で選択され、増殖され、薬理学的に処理または変更された（例えば、遺伝的に改変された）細胞を投与する（Bordignon, C.ら、Cell Therapy: Achievements and Perspectives（１９９９年）、Haematologica、８４巻、１１１０～１１４９頁）。このような宿主細胞としては、例えば、本発明のＨＲＳポリペプチドを発現するように遺伝的に改変された、筋細胞、ＰＢＭＣ、マクロファージ、および幹細胞を含めた初代細胞がある。細胞療法の目的は、損傷した組織または臓器の生物学的機能を置き換え、修復、または増強することである（Bordignon, C.ら、（１９９９年）、Haematologica、８４巻、１１１０～１１４９頁）。

【０４４８】

このような方法のいくつかの態様では、宿主細胞は、ＨＲＳポリペプチドを分泌し、したがって、宿主細胞が移植されている組織または臓器内で、ＨＲＳポリペプチドの持続可能な源を提供する。

他の治療剤

【０４４９】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている組成物および方法は、抗体、抗体断片または非ＨＲＳポリペプチド結合タンパク質を用いて、抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素自己抗体の活性を遮断することができる。いくつかの態様において、抗体または結合タンパク質は、自己抗体の抗原結合ドメインに対するものであり、即ち、抗体は、抗イディオタイプ抗体を表し、これにより、自己抗体の活性を選択的に遮断する。したがって、係る結合剤は、自己免疫疾患に関連するヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体によって媒介される疾患、障害または他の状態の診断、処置または予防に使用することができる。

【０４５０】

用語「抗体」は、天然であれ、部分的にまたは全体的に合成により産生されたものであれ、免疫グロブリンを説明する。この用語は、抗原結合ドメインであるまたはそれと相同である結合ドメインを有するいかなるポリペプチドまたはタンパク質も網羅する。そのＣＤＲのうち１個または複数が、本明細書に開示または特許請求されている方法のいずれかを使用して同定、クローニングまたは選択されたＢ細胞から得られた抗体に由来する、二重特異性抗体およびヒト化抗体を含むＣＤＲ移植抗体も、この用語によって考慮されている。

【０４５１】

「天然ＩｇＧ抗体」および「天然ＩｇＧ免疫グロブリン」は、典型的には、２本の同一軽（Ｌ）鎖および２本の同一重（Ｈ）鎖で構成された、約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、場合によっては、１個の共有結合的ジスルフィド結合により重鎖に連結されるが、ジスルフィド連結の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変動する。各重および軽鎖は、一定の間隔を置いた鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン（「V_H」）を有し、続いて、多数の定常ドメイン（「C_H」）を有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（「V_L」）を有し、その他端に定常ドメイン（「C_L」）を有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第１の定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基は、軽および重鎖可変ドメインの間の界面を形成すると考えられる。

【０４５２】

用語「可変ドメイン」は、ファミリーメンバー間で（即ち、異なるアイソフォームまたは異なる種間で）配列が大規模に異なるタンパク質ドメインを指す。抗体に関して、用語

「可変ドメイン」は、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合および特異性において使用される抗体の可変ドメインを指す。しかし、可変性は、抗体の可変ドメイン中に規則的に分布している訳ではない。これは、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方における超可変領域と呼ばれる３個のセグメントに濃縮されている。可変ドメインのより高度に保存された部分は、「フレームワーク領域」または「ＦＲ」と呼ばれる。無修飾重および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、３個の超可変領域により接続された、多くの場合β－シート立体配置をとる４個のＦＲ（それぞれＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）を含み、超可変領域は、β－シート構造を接続し、場合によってはその一部を形成するループを形成する。各鎖における超可変領域は、ＦＲによってまた他の鎖由来の超可変領域と密接して一体に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第５版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md（１９９１年）、６４７　６６９頁を参照）。定常ドメインは、抗原と抗体との結合に直接的に関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与等、様々なエフェクター機能を提示する。

【０４５３】

用語「超可変領域」は、本明細書において使用される場合、抗原結合の原因である抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、抗原に相補的な様式で直接的に結合し、それぞれＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３として公知の３個の「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」由来のアミノ酸残基を含む。

【０４５４】

軽鎖可変ドメインにおいて、ＣＤＲは、およそ残基２４～３４（ＣＤＲＬ１）、５０～５６（ＣＤＲＬ２）および８９～９７（ＣＤＲＬ３）に相当し、重鎖可変ドメインにおいて、ＣＤＲは、およそ残基３１～３５（ＣＤＲＨ１）、５０～６５（ＣＤＲＨ２）および９５～１０２（ＣＤＲＨ３）に相当する；Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第５版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.（１９９１年））、および／または「超可変ループ」由来の残基（即ち、軽鎖可変ドメインにおける残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）および９１～９６（Ｌ３）ならびに重鎖可変ドメインにおける２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）および９６～１０１（Ｈ３）；Chothia and Lesk J.、Mol. Biol.１９６巻：９０１～９１７頁（１９８７年））である。

【０４５５】

本明細書において使用される場合、「可変フレームワーク領域」または「ＶＦＲ」は、抗原に接触し得る抗原結合ポケットおよび／または溝の一部を形成するフレームワーク残基を指す。いくつかの実施形態において、フレームワーク残基は、抗原結合ポケットまたは溝の一部であるループを形成する。ループにおけるアミノ酸残基は、抗原に接触してもしなくてもよい。一実施形態において、ＶＦＲのループアミノ酸は、抗体、抗体重鎖または抗体軽鎖の三次元構造の検査によって決定される。三次元構造は、溶媒に到達できるアミノ酸ポジションに関して解析することができ、その理由として、係るポジションは、抗体可変ドメインにおいてループを形成するおよび／または抗原接触を為す可能性が高いからである。溶媒に到達できるポジションのいくつかは、アミノ酸配列多様性を許容することができ、その他（例えば、構造的ポジション）は、多様化が低くなり得る。抗体可変ドメインの三次元構造は、結晶構造またはタンパク質モデリングに由来し得る。いくつかの実施形態において、ＶＦＲは、Kabatら、１９９１年に従って定義されるポジションである、重鎖可変ドメインのアミノ酸ポジション７１～７８に相当するアミノ酸ポジションを含む、これから本質的になるまたはこれからなる。いくつかの実施形態において、ＶＦＲは、ＣＤＲＨ２およびＣＤＲＨ３の間に位置するフレームワーク領域３の一部を形成する。好ましくは、ＶＦＲは、標的抗原と接触するまたは抗原結合ポケットの一部を形成するよう十分にポジション付けられたループを形成する。

【０４５６】

免疫グロブリンは、その重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスに割

り当てることができる。主要５クラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭの免疫グロブリンが存在し、このうちいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡおよびＩｇＡ２へとさらに分けることができる。異なるクラスの免疫グロブリンに相当する重鎖定常ドメイン（Ｆｃ）は、それぞれα、δ、ε、γおよびμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置は、周知のものである。いずれかの脊椎動物種に由来する抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパー（「κ」）およびラムダ（「λ」）と呼ばれる２種の明らかに別個の型の一方に割り当てることができる。

【０４５７】

用語「抗体の抗原結合部分」、「抗原結合性断片」、「抗原結合ドメイン」、「抗体断片」または「抗体の機能的断片」は、抗原に特異的に結合する能力を保持する、抗体の１種または複数種の断片を意味するよう本発明において互換的に使用されている（例えば、Holligerら、Nature Biotech.２３巻（９号）：１１２６～１１２９頁（２００５年）を参照）。用語、抗体の「抗原結合部分」の内に含まれるがこれに限定されない抗体断片の非限定的な例として、（ｉ）Ｆａｂ断片、V_L、V_H、C_LおよびC_{H1}ドメインからなる一価断片；（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋によって連結された２個のＦａｂ断片を含む二価断片；（ｉｉｉ）V_HおよびC_{H1}ドメインからなるＦｄ断片；（ｉｖ）抗体の単腕のV_LおよびV_HドメインからなるＦｖ断片；（ｖ）V_HドメインからなるｄＡｂ断片（Wardら、（１９８９年）Nature ３４１巻：５４４～５４６頁）；ならびに（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が挙げられる。さらに、Ｆｖ断片の２個のドメイン、V_LおよびV_Hは、別々の遺伝子にコードされているが、これらは、V_LおよびV_H領域が対になって一価分子を形成する単一タンパク質鎖として産生されることを可能にする合成リンカーにより、組換え方法を使用して連結させることができる（単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として公知；例えば、Birdら、（１９８８年）Science ２４２巻：４２３～４２６頁；およびHustonら、（１９８８年）PNAS USA.８５巻：５８７９～５８８３頁；およびOsbournら、（１９９８年）Nat. Biotechnol.１６巻：７７８頁を参照）。係る単鎖抗体もまた、用語、抗体の「抗原結合部分」の内に包含されるよう企図される。特異的ｓｃＦｖのいずれかのV_HおよびV_L配列を、ヒト免疫グロブリン定常領域ｃＤＮＡまたはゲノム配列に連結して、完全ＩｇＧ分子または他のアイソタイプをコードする発現ベクターを作製することができる。V_HおよびV_Lは、タンパク質化学または組換えＤＮＡ技術のいずれかを使用した、免疫グロブリンのＦａｂ、Ｆｖまたは他の断片の作製において使用することもできる。ダイアボディ（diabody）等、他の形態の単鎖抗体も包含されている。

【０４５８】

「Ｆ（ａｂ’）$_2$」および「Ｆａｂ’」部分は、ペプシンおよびパパイン等、プロテアーゼで免疫グロブリン（モノクローナル抗体）を処理することにより産生することができ、２本のＨ鎖それぞれにおけるヒンジ領域の間に存在するジスルフィド結合付近で免疫グロブリンを消化することにより作製された抗体断片を含む。例えば、パパインは、２本のＨ鎖それぞれにおけるヒンジ領域の間に存在するジスルフィド結合の上流でＩｇＧを切断して、V_L（Ｌ鎖可変領域）およびC_L（Ｌ鎖定常領域）で構成されたＬ鎖ならびにV_H（Ｈ鎖可変領域）および$C_{H\gamma 1}$（Ｈ鎖定常領域におけるγ１領域）で構成されたＨ鎖断片が、ジスルフィド結合によりそのＣ末端領域において接続された、２個の相同抗体断片を作製する。これら２個の相同抗体断片のそれぞれは、Ｆａｂ’と呼ばれる。ペプシンは、２本のＨ鎖それぞれにおけるヒンジ領域の間に存在するジスルフィド結合の下流でＩｇＧを切断して、上述のＦａｂ’２個がヒンジ領域において接続された断片よりも僅かに大きい抗体断片を作製する。この抗体断片は、Ｆ（ａｂ’）$_2$と呼ばれる。

【０４５９】

Ｆａｂ断片は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第１の定常ドメイン（C_H1）も含有する。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域由来の１個または複数のシステイン（複数可）等

、重鎖C_H1ドメインのカルボキシル末端に数残基の付加があるという点においてＦａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、本明細書において、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を生じたＦａｂ’の命名である。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体断片は元々、その間にヒンジシステインを有するＦａｂ’断片対として産生された。抗体断片の他の化学カップリングも公知のものである。

【０４６０】

「Ｆｖ」は、完全抗原認識および抗原結合部位を含有する最小抗体断片である。この領域は、緊密に非共有結合的会合した１本の重鎖および１本の軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この立体配置において、これは、各可変ドメインの３個の超可変領域が相互作用して、V_H－V_L二量体の表面における抗原結合部位を画定する。まとめると、６個の超可変領域は、抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な３個の超可変領域のみを含むＦｖの半分）であっても、結合部位全体よりも低い親和性であるが、抗原を認識および結合する能力を有する。

【０４６１】

「単鎖Ｆｖ」または「ｓＦｖ」抗体断片は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは、単一ポリペプチド鎖において存在する。いくつかの実施形態において、Ｆｖポリペプチドは、V_HおよびV_Lドメインの間に、ｓＦｖに抗原結合に所望の構造を形成させるポリペプチドリンカーをさらに含む。ｓＦｖ分子の総説に関して、例えば、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、１１３巻、Rosenburg and Moore編、Springer-Verlag、New York、２６９～３１５頁（１９９４年）を参照されたい。

【０４６２】

本明細書において使用される場合、「天然」または「天然起源の」抗体または抗体可変ドメインは、非合成供給源から、例えば、生殖系列配列またはｅｘ ｖｉｖｏで得られる分化した抗原特異的Ｂ細胞またはその相当するハイブリドーマ細胞株から、あるいは動物の血清から同定される抗体または抗体可変ドメインの配列を有する抗体または抗体可変ドメインを指す。これらの抗体は、天然にまたは他の仕方で誘導されたいずれかの種類の免疫応答において作製された抗体を含むことができる。天然抗体は、アミノ酸配列および係る抗体を構成またはコードするヌクレオチド配列、例えば、Ｋａｂａｔデータベースにおいて同定される配列を含む。

【０４６３】

抗体は、当業者に公知の種々の技法のいずれかにより調製することができる。例えば、Harlow and Lane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、１９８８年を参照されたい。目的のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、例えば、Kohler and Milstein、Eur. J. Immunol.６巻：５１１～５１９頁、１９７６年およびその改善技法を使用して調製することができる。ヒト抗体を発現するためのマウス等、トランスジェニック動物を利用する方法も含まれる。例えば、Neubergerら、Nature Biotechnology １４巻：８２６頁、１９９６年；Lonbergら、Handbook of Experimental Pharmacology １１３巻：４９～１０１頁、１９９４年；およびLonbergら、Internal Review of Immunology １３巻：６５～９３頁、１９９５年を参照されたい。特定の例として、ＲＥＧＥＲＮＥＲＥＸ（登録商標）によるＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（登録商標）プラットフォーム（例えば、米国特許第６，５９６，５４１号を参照）が挙げられる。抗体は、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイライブラリーの使用により作製または同定することもできる（例えば、米国特許第７，２４４，５９２号；Chaoら、Nature Protocols.１巻：７５５～７６８頁、２００６年を参照）。利用できるライブラリーの非限定的な例として、ヒト抗体レパートリーの構造的多様性が７種の重鎖および７種の軽鎖可変領域遺伝子により表される、ヒトコンビナトリアル抗体ライブラリー（ＨｕＣＡＬ）等、クローニングまたは合成ライブラリーが挙げられる。これら遺伝子の組合せは、マスターライブラリーにおいて４９種のフレームワークを生じる。これらのフレームワークにおいて高度可変遺伝的カセット（ＣＤＲ＝相補性決定領域）を重ね合わ

せることにより、莫大なヒト抗体レパートリーを再現することができる。軽鎖可変領域、重鎖ＣＤＲ－３、重鎖ＣＤＲ－１における多様性をコードする合成ＤＮＡおよび重鎖ＣＤＲ－２における多様性をコードする合成ＤＮＡをコードするヒトドナー供給源の断片により設計されたヒトライブラリーも含まれる。使用に適した他のライブラリーは、当業者に明らかとなるであろう。

【０４６４】

別の一態様において、本発明は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体に結合特異性を提示する可溶性受容体、アドネクチン（adnectin）、ペプチド、ペプチドミメティック、アプタマー等、抗体代替物または他の結合剤ならびにこれを使用する組成物および方法をさらに提供する。結合剤は、本明細書に記載されている治療方法および組成物のいずれかにおいて使用することができる。アドネクチン、可溶性受容体、アビマー（avimer）およびトリネクチン（trinectin）等、生物製剤に基づく結合剤が特に有用である。

【０４６５】

ある特定の実施形態において、係る結合剤は、自己免疫疾患に関連するヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体の遮断に有効である。したがって、係る結合剤は、その活性を部分的にまたは完全にアンタゴナイズまたはアゴナイズすることによる等、自己免疫疾患に関連するヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体によって媒介される疾患、障害または他の状態の診断、処置または予防に使用することができる。

【０４６６】

上に記す通り、「ペプチド」は、結合剤として含まれている。用語、ペプチドは、典型的には、アミノ酸残基のポリマーならびにそのバリアントおよび合成アナログを指す。ある特定の実施形態において、用語「ペプチド」は、約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５または５０（その中間のあらゆる整数および範囲（例えば、５～１０、８～１２、１０～１５）を含む）アミノ酸からなり、自己免疫疾患に関連するヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する１種または複数種の自己抗体と相互作用するペプチドを含む相対的に短いポリペプチドを指す。ペプチドは、本明細書に記載されている通り、天然起源のアミノ酸および／または非天然起源のアミノ酸で構成され得る。

【０４６７】

天然起源のアミノ酸のみからなるペプチドに加えて、ペプチド模倣またはペプチドアナログも提供される。ペプチドアナログは、鋳型ペプチドの性質と類似の性質を有する非ペプチド薬として医薬品業界において一般に使用される。これらの種類の非ペプチド化合物は、「ペプチドミメティック」または「ペプチド模倣」と命名される（Luthmanら、A Textbook of Drug Design and Development、１４巻：３８６～４０６頁、第２版、Harwood Academic Publishers（１９９６年）；Joachim Grante、Angew. Chem. Int. Ed. Engl.、３３巻：１６９９～１７２０頁（１９９４年）；Fauchere、J.、Adv. Drug Res.、１５巻：２９頁（１９８６年）；Veber and Freidinger TINS、３９２頁（１９８５年）；およびEvansら、J. Med. Chem.３０巻：２２９頁（１９８７年））。ペプチド模倣は、ペプチドの生物活性を模倣するが、化学的性質においてもはやペプチド性ではない分子である。ペプチド模倣化合物は、当技術分野において公知のものであり、例えば、米国特許第６，２４５，８８６号に記載されている。

【０４６８】

本発明は、ペプトイドも含む。ペプチドのペプトイド誘導体は、生物活性に重要な構造的決定因子を保持するが、ペプチド結合を排除し、これによりタンパク質分解に対する抵抗性を与える修飾ペプチドの別の形態を表す（Simonら、PNAS USA.８９巻：９３６７～９３７１頁、１９９２年）。ペプトイドは、Ｎ－置換グリシンのオリゴマーである。それぞれ天然アミノ酸の側鎖に相当する多くのＮ－アルキル基が記載されてきた。本発明のペプチド模倣は、少なくとも１個のアミノ酸、数個のアミノ酸または全アミノ酸残基が、相当するＮ－置換グリシンに置換された化合物を含む。ペプトイドライブラリーは、例えば

、米国特許第５，８１１，３８７号に記載されている。

【０４６９】

アプタマーも結合剤として含まれている（例えば、Ellingtonら、Nature.３４６巻、８１８～２２頁、１９９０年；およびTuerkら、Science.２４９巻、５０５～１０頁、１９９０年を参照）。アプタマーの例として、核酸アプタマー（例えば、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー）およびペプチドアプタマーが挙げられる。核酸アプタマーは、一般に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ選択の反復ラウンドまたはＳＥＬＥＸ（試験管内進化法（systematic evolution of ligands by exponential enrichment））等の等価な方法によって、小分子、タンパク質、核酸や、さらには細胞、組織および生物等、様々な分子標的に結合するよう操作された核酸種を指す。例えば、米国特許第６，３７６，１９０号；および同第６，３８７，６２０号を参照されたい。したがって、本明細書に記載されているＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはその細胞結合パートナーに結合する核酸アプタマーが含まれている。

【０４７０】

ペプチドアプタマーは、典型的には、その両端がタンパク質足場に付着した可変ペプチドループを含み、この二重の構造的制約は、ペプチドアプタマーの結合親和性を抗体に匹敵するレベルまで典型的に増加させる（例えば、ナノモル濃度範囲において）。ある特定の実施形態において、可変ループ長は、約１０～２０アミノ酸（中間の全整数を含む）で構成され得、足場は、優れた溶解性およびコンパクトな（compacity）性質を有するいずれかのタンパク質を含み得る。特定の例示的な実施形態は、足場タンパク質として細菌タンパク質チオレドキシン－Ａを利用することができ、可変ループが、還元性活性部位（野生型タンパク質における－Ｃｙｓ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｃｙｓ－ループ）内に挿入され、２個のシステイン側方鎖が、ジスルフィド架橋を形成することができる。ペプチドアプタマーを同定するための方法は、例えば、米国特許出願公開第２００３／０１０８５３２号に記載されている。したがって、本明細書に記載されているＡＡＲＳポリペプチドおよび／またはその細胞結合パートナーに結合するペプチドアプタマーが含まれている。ペプチドアプタマー選択は、酵母ツーハイブリッドシステムを含む、当技術分野において公知の異なるシステムを使用して行うことができる。

【０４７１】

本発明のＡＡＲＳタンパク質断片に特異的に結合するＡＤＮＥＣＴＩＮＳ（商標）、ＡＶＩＭＥＲＳ（商標）、アナホン（anaphone）およびアンチカリン（anticalin）も含まれている。ＡＤＮＥＣＴＩＮＳ（商標）は、他のタンパク質に天然に結合する豊富な細胞外タンパク質である、ヒトフィブロネクチンに由来する標的化された生物製剤のクラスを指す。例えば、米国特許出願公開第２００７／００８２３６５号；同第２００８／０１３９７９１号；および同第２００８／０２２００４９号を参照されたい。ＡＤＮＥＣＴＩＮＳ（商標）は、典型的には、天然フィブロネクチン骨格と共に、ヒトフィブロネクチンの特異的部分の複数の標的ドメインからなる。標的ドメインは、ＡＤＮＥＣＴＩＮ（商標）が、自己免疫疾患に関連するヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体を特異的に認識できるよう操作することができる。

【０４７２】

ＡＶＩＭＥＲＳ（商標）は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏエクソンシャッフリングおよびファージディスプレイを使用して操作された多量体の結合タンパク質またはペプチドを指す。複数の結合ドメインが連結され、単一エピトープ免疫グロブリンドメインと比較してより優れた親和性および特異性をもたらす。例えば、Silvermanら、Nature Biotechnology.２３巻：１５５６～１５６１頁、２００５年；米国特許第７，１６６，６９７号；ならびに米国特許出願公開第２００４／０１７５７５６号、同第２００５／００４８５１２号、同第２００５／００５３９７３号、同第２００５／００８９９３２号および同第２００５／０２２１３８４号を参照されたい。

【０４７３】

創薬および薬物開発において、標的結合のために抗体に優る利点を提供し得る非免疫グ

ロブリンタンパク質のクラスを含む、設計されたアンキリン反復タンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）も含まれている。他の使用の中でも、ＤＡＲＰｉｎは、小さなサイズおよび高い安定性を含むその好ましい分子的性質により、毒素または他の治療ペイロードのｉｎ　ｖｉｖｏイメージングまたは送達に理想的に適している。多くの標的特異的ＤＡＲＰｉｎの細菌における低コスト生産および迅速な作製は、ＤＡＲＰｉｎアプローチを創薬に有用なものとする。その上、ＤＡＲＰｉｎは、多選択性形式で容易に作製することができ、特異的な器官にエフェクターＤＡＲＰｉｎを標的化する、あるいは数個のＤＡＲＰｉｎで構成された１分子により複数の受容体を標的化する潜在力を提供する。例えば、Stumppら、Curr Opin Drug Discov Devel.１０巻：１５３～１５９頁、２００７年；米国特許出願公開第２００９／００８２２７４号；および国際出願ＰＣＴ／ＥＰ２００１／１０４５４号を参照されたい。

【０４７４】

ある特定の実施形態は、標的結合のための複数の表面ループをディスプレイする足場として、ヒトフィブロネクチンの１０番目のフィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン（ＦＮｆｎ１０）を典型的に利用する「モノボディ（monobody）」を含む。ＦＮｆｎ１０は、免疫グロブリンフォールドと類似のβ－サンドイッチ構造を有する小型の（９４残基）タンパク質である。これは、ジスルフィド結合または金属イオンなしで高度に安定的であり、細菌において高レベルで正確にフォールドされた形態で発現させることができる。ＦＮｆｎ１０足場は、実質的にいかなるディスプレイ技術とも適合性である。例えば、Batoriら、Protein Eng.１５巻：１０１５～２０頁、２００２年；およびWojcikら、Nat Struct Mol Biol.、２０１０年；および米国特許第６，６７３，９０１号を参照されたい。

【０４７５】

アンチカリンは、構造的に強固なフレームワークによって支持される超可変ループ領域を有する結合タンパク質のファミリーである、ヒトリポカリンから典型的に合成される抗体ミメティックのクラスを指す。例えば、米国特許出願公開第２００６／００５８５１０号を参照されたい。アンチカリンは、典型的には、約２０ｋＤａのサイズを有する。アンチカリンは、４個のペプチドループおよび付着されたα－ヘリックスによってペアワイズに接続された８個の逆平行β－ストランドにより形成されるバレル構造（安定的β－バレル足場）によって特徴付けることができる。ある特定の態様において、特異的結合を達成するための立体構造的逸脱が、超可変ループ領域（複数可）において為される。例えば、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、Skerra、FEBS Ｊ.２７５巻：２６７７～８３頁、２００８年を参照されたい。

治療用組成物、医薬製剤、投与およびキット

【０４７６】

本発明の実施形態は、本明細書に記載されている炎症性疾患（複数可）、筋ジストロフィー、横紋筋融解症、カヘキシーおよび他の疾患を処置するための治療用または医薬組成物であって、１種または複数種の非カノニカル活性を保有する少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む組成物を含む。

【０４７７】

自己免疫疾患（複数可）を処置するための治療用または医薬組成物であって、１種または複数種の非カノニカル活性を保有する少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む組成物も含まれている。

【０４７８】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載されている自己免疫疾患、炎症性疾患（複数可）、筋ジストロフィー、横紋筋融解症、カヘキシーおよび他の疾患を処置するための治療用または医薬組成物であって、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する自己抗体に関連する疾患由来の自己抗体または自己反応性Ｔ細胞と特異的に交差反応する少なくとも１個のエピトープを含む、および／または１種または複数種の非カノニカル活性を保有する少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む組成物に関する。ある特定の実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１個のＴｈエピトー

プを含む。

【０４７９】

いくつかの実施形態は、本明細書に記載されている自己免疫疾患、炎症性疾患（複数可）、筋ジストロフィー、横紋筋融解症、カヘキシーおよび他の疾患を処置するための治療用または医薬組成物であって、組成物が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１個のエピトープを含む、および／または１種または複数種の非カノニカル活性を保有する哺乳動物ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸を含み、核酸が、細胞におけるＨＲＳの発現を可能にするよう発現コントロール配列に作動可能にカップリングされた組成物を含む。

【０４８０】

ある特定の実施形態は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連する疾患を処置するための治療用または医薬組成物であって、組成物が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１個のエピトープを含む少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を含み、その核酸が、細胞におけるＨＲＳの発現を可能にするよう発現コントロール配列に作動可能にカップリングされた組成物を含む。ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不全に関連する疾患を処置するための治療用または医薬組成物であって、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１種のカノニカルまたは非カノニカル機能に取って代わることのできる少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む組成物も含まれている。

【０４８１】

いくつかの実施形態は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連する疾患を処置するための治療用または医薬組成物であって、最大約1×10^{-7}Ｍの濃度まで、競合的ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む組成物を含む。

【０４８２】

いくつかの実施形態は、ＨＲＳポリペプチドの安定性、均一性、単分散（monodispersion）または活性を増強、最適化または延長する治療用または医薬組成物を含む。

本発明において、ＨＲＳポリペプチドの少なくとも約４００アミノ酸のポリペプチドを含む医学的に有用な治療用または医薬組成物であって、ポリペプチドが、

ａ）少なくとも約９５％純粋であり、

ｂ）約５％未満凝集しており、

ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない

組成物も含まれている。

【０４８３】

別の一実施形態において、医学的に有用な治療用または医薬組成物は、約４０～８０アミノ酸の間のＨＲＳポリペプチドを含み、ポリペプチドは、

ａ）少なくとも約９５％純粋であり、

ｂ）約５％未満凝集しており、

ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない。

【０４８４】

自己免疫疾患の処置のための医薬の調製における、ＨＲＳポリペプチドの新たな医学使用も含まれている。

【０４８５】

このような治療用組成物および使用のいずれかにおいて、組成物は、単独でまたは１種もしくは複数の他の治療様式と組合せて、細胞、被験体または動物への投与のための薬学的に許容される、生理学的に許容されるおよび／または医薬品グレードの溶液において製剤化することができる。必要に応じて、本発明の組成物を、例えば、他のタンパク質またはポリペプチドまたは薬学的活性剤等、他の薬剤と同様に組合せて投与してよいことも理解できよう。このような文脈において、「組合せて投与される」は、（１）同一単位剤形の一部および（２）別々の投与、但し同一治療的処置プログラムまたはレジメンの一部と

しての、典型的には同日中の、但し必ずしもそうでなくてもよい投与を含む。

【０４８６】

いくつかの実施形態において、組成物は、２種以上のＨＲＳポリペプチドの混合物を含む。いくつかの態様において、組成物は、本明細書に記載されている約２～約５０または約２～約２５または約２～約１５または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５種以上のＨＲＳポリペプチドを含むことができる。

【０４８７】

治療用量のＨＲＳポリペプチドを含む治療用または医薬組成物は、本明細書に記載されているヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素のいずれか１種または複数種のホモログ、オルソログ、バリアント、断片、修飾ポリペプチドおよび／または天然起源のアイソフォーム（例えば、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２もしくは１７６～１８２のいずれかまたは表Ｄ１～Ｄ９に収載されているもしくはそれに由来し得るＨＲＳポリペプチドもしくは核酸のいずれか）を含む。

【０４８８】

いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、最大で約１×１０$^{-7}$Ｍの濃度まで、競合的ＥＬＩＳＡにおいて野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合に対し有意に競合しない。したがって、いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、競合的ＥＬＩＳＡにおいて測定される通り、疾患関連自己抗体に対し野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（配列番号１）よりも低い親和性を有する。いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、野生型ヒト（配列番号１）に対する疾患関連自己抗体の親和性よりも少なくとも約１０倍低いまたは少なくとも約２０倍低いまたは少なくとも約５０倍低いまたは少なくとも約１００倍低い、疾患関連自己抗体に対する見かけ上の親和性を有する。

【０４８９】

医薬品生産のため、ＨＲＳポリペプチド組成物は、典型的には、実質的にエンドトキシンを含まないであろう。エンドトキシンは、特定の細菌、典型的にはグラム陰性細菌に関連する毒素であるが、エンドトキシンは、Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ等、グラム陽性細菌にも存在し得る。最も蔓延したエンドトキシンは、様々なグラム陰性細菌の外膜に存在するリポ多糖（ＬＰＳ）またはリポオリゴ糖（ＬＯＳ）であり、これらは、疾患を引き起こすこのような細菌の能力における中心的病原性特色を表す。ヒトにおける少量のエンドトキシンは、他の有害生理学的効果の中でもとりわけ、発熱させ、血圧を下げ、炎症および凝固を活性化させることができる。

【０４９０】

エンドトキシンは、当技術分野において公知のルーチン技法を使用して検出することができる。例えば、カブトガニ由来の血液を利用するＬｉｍｕｌｕｓ Ａｍｅｏｂｏｃｙｔｅライセートアッセイは、エンドトキシンの存在を検出するための非常に高感度なアッセイである。この検査において、非常に低レベルのＬＰＳは、この反応を増幅する強力な酵素カスケードにより、ｌｉｍｕｌｕｓライセートを検出可能に凝固させることができる。エンドトキシンは、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）により定量化することもできる。

【０４９１】

実質的にエンドトキシンを含まないために、エンドトキシンレベルは、約０．００１、０．００５、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０８、０．０９、０．１、０．５、１．０、１．５、２、２．５、３、４、５、６、７、８、９または１０ＥＵ／ｍｇまたはそれ未満のタンパク質となり得る。典型的には、１ｎｇのリポ多糖（ＬＰＳ）は、約１～１０ＥＵに相当する。

【０４９２】

ある特定の実施形態において、組成物は、約１０ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約９ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約８ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約７ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリ

ペプチド、約６ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約５ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約４ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約３ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約２ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約１ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約１ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約０．１ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチド、約０．１ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチドまたは約０．０１ＥＵ／ｍｇもしくはそれ未満のＨＲＳポリペプチドのエンドトキシン含量を有する。ある特定の実施形態において、上に記す通り、組成物は、ｗｔ／ｗｔタンパク質基盤で少なくとも約９５％、９６％、９７％もしくは９８％エンドトキシンを含まない、少なくとも約９９％エンドトキシンを含まない、少なくとも約９９．５％エンドトキシンを含まないまたは少なくとも約９９．９９％エンドトキシンを含まない。

【０４９３】

いくつかの実施形態において、組成物は、１種または複数種のｐＨ緩衝剤、即ち、緩衝剤を含む。例示的な緩衝剤として、ヒスチジン（例えば、Ｌ－ヒスチジン、Ｄ－ヒスチジン）、クエン酸（citrate）緩衝剤（例えば、クエン酸ナトリウム、クエン酸、これらの混合物）およびリン酸（phosphate）緩衝剤（例えば、リン酸ナトリウム、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ））が挙げられる。

【０４９４】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約０．３ｍＭ～約１００ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約９５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約９０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約８５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約８０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約７５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約７０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約６５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約６０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約５５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約５０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約４５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約４０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約３５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約３０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約２５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約２０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約１５ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約１０ｍＭまたは約０．３ｍＭ～約５ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０４９５】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約１ｍＭ～約１００ｍＭ、または約１ｍＭ～約９５ｍＭ、または約１ｍＭ～約９０ｍＭ、または約１ｍＭ～約８５ｍＭ、または約１ｍＭ～約８０ｍＭ、または約１ｍＭ～約７５ｍＭ、または約１ｍＭ～約７０ｍＭ、または約１ｍＭ～約６５ｍＭ、または約１ｍＭ～約６０ｍＭ、または約１ｍＭ～約５５ｍＭ、または約１ｍＭ～約５０ｍＭ、または約１ｍＭ～約４５ｍＭ、または約１ｍＭ～約４０ｍＭ、または約１ｍＭ～約３５ｍＭ、または約１ｍＭ～約３０ｍＭ、または約１ｍＭ～約２５ｍＭ、または約１ｍＭ～約２０ｍＭ、または約１ｍＭ～約１５ｍＭ、または約１ｍＭ～約１０ｍＭ、または約１ｍＭ～約５ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０４９６】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約２ｍＭ～約１００ｍＭ、または約２ｍＭ～約９５ｍＭ、または約２ｍＭ～約９０ｍＭ、または約２ｍＭ～約８５ｍＭ、または約２ｍＭ～約８０ｍＭ、または約２ｍＭ～約７５ｍＭ、または約２ｍＭ～約７０ｍＭ、または約２ｍＭ～約６５ｍＭ、または約２ｍＭ～約６０ｍＭ、または約２ｍＭ～約５５ｍＭ、または約２ｍＭ～約５０ｍＭ、または約２ｍＭ～約４５ｍＭ、または約２ｍＭ～約４０ｍＭ、または約２ｍＭ～約３５ｍＭ、または約２ｍＭ～約３０ｍＭ、または約２ｍＭ～約２５ｍＭ、または約２ｍＭ～約２０ｍＭ、または約２ｍＭ～約１５ｍＭ、または約２ｍＭ～約１０ｍＭ、または約２ｍＭ～約５ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０４９７】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約５ｍＭ～約９０ｍＭ、または約５ｍＭ～約８５ｍＭ、または約５ｍＭ～約８０ｍＭ、または約５ｍＭ～約７５ｍＭ、または約５ｍＭ～約７０ｍＭ、または約５ｍＭ～約６５ｍＭ、または約５ｍＭ～約６０ｍＭ、または約５ｍＭ～約５５ｍＭ、また

は約５ｍＭ～約５０ｍＭ、または約５ｍＭ～約４５ｍＭ、または約５ｍＭ～約４０ｍＭ、または約５ｍＭ～約３５ｍＭ、または約５ｍＭ～約３０ｍＭ、または約５ｍＭ～約２５ｍＭ、または約５ｍＭ～約２０ｍＭ、または約５ｍＭ～約１５ｍＭ、または約５ｍＭ～約１０ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０４９８】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約１０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約１０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約１０ｍＭ～約９０ｍＭ、または約１０ｍＭ～約８５ｍＭ、または約１０ｍＭ～約８０ｍＭ、または約１０ｍＭ～約７５ｍＭ、または約１０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約１０ｍＭ～約６５ｍＭ、または約１０ｍＭ～約６０ｍＭ、または約１０ｍＭ～約５５ｍＭ、または約１０ｍＭ～約５０ｍＭ、または約１０ｍＭ～約４５ｍＭ、または約１０ｍＭ～約４０ｍＭ、または約１０ｍＭ～約３５ｍＭ、または約１０ｍＭ～約３０ｍＭ、または約１０ｍＭ～約２５ｍＭ、または約１０ｍＭ～約２０ｍＭ、または約１０ｍＭ～約１５ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０４９９】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約１５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約１５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約１５ｍＭ～約９０ｍＭ、または約１５ｍＭ～約８５ｍＭ、または約１５ｍＭ～約８０ｍＭ、または約１５ｍＭ～約７５ｍＭ、または約１５ｍＭ～約７０ｍＭ、または約１５ｍＭ～約６５ｍＭ、または約１５ｍＭ～約６０ｍＭ、または約１５ｍＭ～約５５ｍＭ、または約１５ｍＭ～約５０ｍＭ、または約１５ｍＭ～約４５ｍＭ、または約１５ｍＭ～約４０ｍＭ、または約１５ｍＭ～約３５ｍＭ、または約１５ｍＭ～約３０ｍＭ、または約１５ｍＭ～約２５ｍＭ、または約１５ｍＭ～約２０ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５００】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約２０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約２０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約２０ｍＭ～約９０ｍＭ、または約２０ｍＭ～約８５ｍＭ、または約２０ｍＭ～約８０ｍＭ、または約２０ｍＭ～約７５ｍＭ、または約２０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約２０ｍＭ～約６５ｍＭ、または約２０ｍＭ～約６０ｍＭ、または約２０ｍＭ～約５５ｍＭ、または約２０ｍＭ～約５０ｍＭ、または約２０ｍＭ～約４５ｍＭ、または約２０ｍＭ～約４０ｍＭ、または約２０ｍＭ～約３５ｍＭ、または約２０ｍＭ～約３０ｍＭ、または約２０ｍＭ～約２５ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０１】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約２５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約２５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約２５ｍＭ～約９０ｍＭ、または約２５ｍＭ～約８５ｍＭ、または約２５ｍＭ～約８０ｍＭ、または約２５ｍＭ～約７５ｍＭ、または約２５ｍＭ～約７０ｍＭ、または約２５ｍＭ～約６５ｍＭ、または約２５ｍＭ～約６０ｍＭ、または約２５ｍＭ～約５５ｍＭ、または約２５ｍＭ～約５０ｍＭ、または約２５ｍＭ～約４５ｍＭ、または約２５ｍＭ～約４０ｍＭ、または約２５ｍＭ～約３５ｍＭ、または約２５ｍＭ～約３０ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０２】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約３０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約３０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約３０ｍＭ～約９０ｍＭ、または約３０ｍＭ～約８５ｍＭ、または約３０ｍＭ～約８０ｍＭ、または約３０ｍＭ～約７５ｍＭ、または約３０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約３０ｍＭ～約６５ｍＭ、または約３０ｍＭ～約６０ｍＭ、または約３０ｍＭ～約５５ｍＭ、または約３０ｍＭ～約５０ｍＭ、または約３０ｍＭ～約４５ｍＭ、または約３０ｍＭ～約４０ｍＭ、または約３０ｍＭ～約３５ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０３】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約３５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約３５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約３５ｍＭ～約９０ｍＭ、または約３５ｍＭ～約８５ｍＭ、または約３５ｍＭ～約８０ｍＭ、または約３５ｍＭ～約７５ｍＭ、または約３５ｍＭ～約７０ｍＭ、または約３５ｍＭ～約６５ｍＭ、または約３５ｍＭ～約６０ｍＭ、または約３５ｍ

Ｍ～約５５ｍＭ、または約３５ｍＭ～約５０ｍＭ、または約３５ｍＭ～約４５ｍＭ、または約３５ｍＭ～約４０ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０４】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約４０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約４０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約４０ｍＭ～約９０ｍＭ、または約４０ｍＭ～約８５ｍＭ、または約４０ｍＭ～約８０ｍＭ、または約４０ｍＭ～約７５ｍＭ、または約４０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約４０ｍＭ～約６５ｍＭ、または約４０ｍＭ～約６０ｍＭ、または約４０ｍＭ～約５５ｍＭ、または約４０ｍＭ～約５０ｍＭ、または約４０ｍＭ～約４５ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０５】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約４５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約４５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約４５ｍＭ～約９０ｍＭ、または約４５ｍＭ～約８５ｍＭ、または約４５ｍＭ～約８０ｍＭ、または約４５ｍＭ～約７５ｍＭ、または約４５ｍＭ～約７０ｍＭ、または約４５ｍＭ～約６５ｍＭ、または約４５ｍＭ～約６０ｍＭ、または約４５ｍＭ～約５５ｍＭ、または約４５ｍＭ～約５０ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０６】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約５０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約５０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約５０ｍＭ～約９０ｍＭ、または約５０ｍＭ～約８５ｍＭ、または約５０ｍＭ～約８０ｍＭ、または約５０ｍＭ～約７５ｍＭ、または約５０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約５０ｍＭ～約６５ｍＭ、または約５０ｍＭ～約６０ｍＭ、または約５０ｍＭ～約５５ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０７】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約５５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約５５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約５５ｍＭ～約９０ｍＭ、または約５５ｍＭ～約８５ｍＭ、または約５５ｍＭ～約８０ｍＭ、または約５５ｍＭ～約７５ｍＭ、または約５５ｍＭ～約７０ｍＭ、または約５５ｍＭ～約６５ｍＭ、または約５５ｍＭ～約６０ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０８】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約６０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約６０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約６０ｍＭ～約９０ｍＭ、または約６０ｍＭ～約８５ｍＭ、または約６０ｍＭ～約８０ｍＭ、または約６０ｍＭ～約７５ｍＭ、または約６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６０ｍＭ～約６５ｍＭの範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約６５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約６５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約６５ｍＭ～約９０ｍＭ、または約６５ｍＭ～約８５ｍＭ、または約６５ｍＭ～約８０ｍＭ、または約６５ｍＭ～約７５ｍＭ、または約６５ｍＭ～約７０ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５０９】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約７０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約７０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約７０ｍＭ～約９０ｍＭ、または約７０ｍＭ～約８５ｍＭ、または約７０ｍＭ～約８０ｍＭ、または約７０ｍＭ～約７５ｍＭの範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約７５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約７５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約７５ｍＭ～約９０ｍＭ、または約７５ｍＭ～約８５ｍＭ、または約７５ｍＭ～約８０ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５１０】

いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約８０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約８０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約８０ｍＭ～約９０ｍＭ、または約８０ｍＭ～約８５ｍＭの範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約８５ｍＭ～約１００ｍＭ、または約８５ｍＭ～約９５ｍＭ、または約８５ｍＭ～約９０ｍＭの範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約９０ｍＭ～約１００ｍＭ、または約９０ｍＭ～約９５ｍＭ、または約９５ｍＭ～約１００ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５１１】
いくつかの実施形態において、緩衝剤は、約４０～６０、４１～６０、４２～６０、４３～６０、４４～６０、４５～６０、４６～６０、４７～６０、４８～６０、４９～６０、５０～６０、５１～６０、５２～６０、５３～６０、５４～６０、５５～６０、５６～６０、５７～６０、５８～６０、５９～６０ｍＭ、または約４０～５９、４１～５９、４２～５９、４３～５９、４４～５９、４５～５９、４６～５９、４７～５９、４８～５９、４９～５９、５０～５９、５１～５９、５２～５９、５３～５９、５４～５９、５５～５９、５６～５９、５７～５９、５８～５９ｍＭ、または約４０～５８、４１～５８、４２～５８、４３～５８、４４～５８、４５～５８、４６～５８、４７～５８、４８～５８、４９～５８、５０～５８、５１～５８、５２～５８、５３～５８、５４～５８、５５～５８、５６～５８、５７～５８ｍＭ、または約４０～５７、４１～５７、４２～５７、４３～５７、４４～５７、４５～５７、４６～５７、４７～５７、４８～５７、４９～５７、５０～５７、５１～５７、５２～５７、５３～５７、５４～５７、５５～５７、５６～５７ｍＭ、または約４０～５６、４１～５６、４２～５６、４３～５６、４４～５６、４５～５６、４６～５６、４７～５６、４８～５６、４９～５６、５０～５６、５１～５６、５２～５６、５３～５６、５４～５６、５５～５６ｍＭ、または約４０～５５、４１～５５、４２～５５、４３～５５、４４～５５、４５～５５、４６～５５、４７～５５、４８～５５、４９～５５、５０～５５、５１～５５、５２～５５、５３～５５、５４～５５ｍＭ、または約４０～５４、４１～５４、４２～５４、４３～５４、４４～５４、４５～５４、４６～５４、４７～５４、４８～５４、４９～５４、５０～５４、５１～５４、５２～５４、５３～５４ｍＭ、または約４０～５３、４１～５３、４２～５３、４３～５３、４４～５３、４５～５３、４６～５３、４７～５３、４８～５３、４９～５３、５０～５３、５１～５３、５２～５３ｍＭ、または約４０～５２、４１～５２、４２～５２、４３～５２、４４～５２、４５～５２、４６～５２、４７～５２、４８～５２、４９～５２、５０～５２、５１～５２ｍＭ、または約４０～５１、４１～５１、４２～５１、４３～５１、４４～５１、４５～５１、４６～５１、４７～５１、４８～５１、４９～５１、５０～５１ｍＭ、または約４０～５０、４１～５０、４２～５０、４３～５０、４４～５０、４５～５０、４６～５０、４７～５０、４８～５０、４９～５０ｍＭ、または約４０～４９、４１～４９、４２～４９、４３～４９、４４～４９、４５～４９、４６～４９、４７～４９、４８～４９ｍＭ、または約４０～４８、４１～４８、４２～４８、４３～４８、４４～４８、４５～４８、４６～４８、４７～４８ｍＭ、または約４０～４７、４１～４７、４２～４７、４３～４７、４４～４７、４５～４７、４６～４７ｍＭ、または約４０～４６、４１～４６、４２～４６、４３～４６、４４～４６、４５～４６ｍＭ、または約４０～４５、４１～４５、４２～４５、４３～４５、４４～４５ｍＭ、または約４０～４４、４１～４４、４２～４４、４３～４４ｍＭ、または約４０～４３、４１～４３、４２～４３ｍＭ、または約４０～４２、４１～４２ｍＭ、または約４０～４２ｍＭの範囲の濃度で存在する。

【０５１２】
いくつかの実施形態において、組成物は、約０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００ｍＭ（中間の全範囲を含む）の濃度の緩衝剤を含む。

【０５１３】

いくつかの実施形態において、緩衝剤の存在は、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有する組成物と比べて、ＨＲＳポリペプチドの１種または複数種の生化学的、物理学的および／または薬物動態学的性質を変更（例えば、改善、増加、減少、低下）する。

【０５１４】

例えば、ある特定の実施形態において、緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドと比べて、増加した生物活性を有する。例示的な活性として、抗炎症性活性および抗体結合（例えば、抗Ｊｏ－１抗体への結合）を含む他の生物活性等、本明細書に記載されている非カノニカル活性のいずれかが挙げられる。いくつかの実施形態において、緩衝液におけるＨＲＳポリペプチドは、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍大きいまたは少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％大きい生物活性を有する。特定の態様において、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤である。

【０５１５】

ある特定の実施形態において、緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、増加した「安定性」（例えば、半減期により測定される）を有し、これは、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍大きいまたは少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％大きい。特定の態様において、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤である。

【０５１６】

いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドの「安定性」は、その「機能的安定性」を含む、あるいはＨＲＳポリペプチドの少なくとも１種の生物活性が、所定のセットの条件下において経時的に低下する速度を含む。例示的な生物活性として、例えば、抗Ｊｏ－１抗体と特異的に交差反応する少なくとも１個のエピトープの保持を含む、本明細書に記載されているカノニカルまたは非カノニカル活性のうちいずれか１種または複数が挙げられる。いくつかの実施形態において、緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチドの生物活性は、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度で低下する。特定の態様において、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤である。

【０５１７】

ある特定の実施形態において、所定のセットの条件下における経時的なＨＲＳポリペプチドの「安定性」は、そのアンフォールド、凝集または沈殿の速度を含む、その「動態学的安定性」または「熱安定性」を含む。ある特定の実施形態において、緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０

、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度でアンフォールド、凝集または沈殿する。

【０５１８】

ある特定の実施形態において、緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物においてインキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度でアンフォールド、凝集または沈殿する。

【０５１９】

いくつかの実施形態において、緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドの融解温度よりも、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％大きい融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの実施形態において、緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０℃高い融解温度（T_m）を有する。特定の態様において、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤である。

【０５２０】

いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドと比べて、緩衝剤の存在下において、改善または増加した均一性または単分散（例えば、単量体／オリゴマーの比、二量体／オリゴマーの比、単量体／二量体の比、二量体／単量体の比、還元条件下での鎖間ジスルフィド結合形成の比、ＳＤＳ－ＰＡＧＥまたはＨＰＬＣ解析のいずれかにより検出される高分子量および／または低分子量ピークの低下を含む、見かけ上の分子量の分布）を有する。いくつかの実施形態において、緩衝剤におけるＨＲＳポリペプチドの均一性または単分散は、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドと比べて、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍または少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％増加する。特定の態様において、緩衝剤は、ｐＨ７．０～約ｐＨ７．５の範囲内のｐＨにおけるヒスチジン緩衝剤または約ｐＨ７．５～約ｐＨ６．５の範囲内のｐＨにおけるクエン酸緩衝剤である。

【０５２１】

ある特定の実施形態において、ヒスチジンまたはクエン酸緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチド組成物は、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物においてインキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプ

チドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による減少した高分子量ピーク（複数可）を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における２日間の貯蔵後に、主要ピークの約２％未満のＳＥ－ＨＰＬＣ解析による高分子量ピーク含量を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における２日間の貯蔵後に、主要ピークの約１％未満の高分子量ピーク含量を有する。

【０５２２】

ある特定の実施形態において、ヒスチジンまたはクエン酸緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチド組成物は、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物においてインキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による減少した低分子量ピーク（複数可）を有する。

【０５２３】

ある特定の実施形態において、ヒスチジンまたはクエン酸緩衝剤の存在下におけるＨＲＳポリペプチド組成物は、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間、緩衝剤なしまたは異なる緩衝剤を有するそれ以外の点では同一または匹敵する組成物においてインキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、減少した濁度（Ａ３４０）を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、約ｐＨ７．０～７．５のヒスチジン緩衝剤を含み、３７℃における２日間の貯蔵後に、約０．５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。特定の態様において、ＨＲＳ組成物は、３７Ｃにおける２日間の貯蔵後に、約０．０５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、約ｐＨ７．０～７．５のクエン酸緩衝剤を含み、３７℃における２日間の貯蔵後に、約０．５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。特定の態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における２日間の貯蔵後に、約０．０５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５２４】

ある特定の実施形態において、組成物（例えば、緩衝化剤または緩衝剤の存在下における）のｐＨは、約６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９または約８．０である。いくつかの実施形態において、組成物のｐＨは、約６．０～６．１、６．０～６．２、６．０～６．３、６．０～６．４、６．０～６．５、６．０～６．６、６．０～６．７、６．０～６．８、６．０～６．９、６．０～７．０、６．０～７．１、６．０～７．２、６．０～７．３、６．０～７．４、６．０～７．５、６．０～７．６、６．０～７．７、６．０～７．８、６．０～７．９、６．０～８．０または約６．５～６．６、６．５～６．７、６．５～６．８、６．５～６．９、６．５～７．０、６．５～７．１、６．５～７．２、６．５～７．３、６．５～７．４、６．５～７．５、６．５～７．６、６．５～７．７、６．５～７．８、６．５～７．９、６．５～８．０または約７．０～７．１、７．０～７．２、７．０～７．３、７．０～７．４、７．０～７．５、７．０～７．６、７．０～７．７、７．０～７．８、７．０～７．９、７．０～８．０または約７．２～７．３、７．２～７．４、７．２～７．５、７．２～７．

６、７．２～７．７、７．２～７．８、７．２～７．９、７．２～８．０または約７．４～７．５、７．４～７．６、７．４～７．７、７．４～７．８、７．４～７．９、７．４～８．０または約７．５～７．６、７．５～７．７、７．５～７．８、７．５～７．９、７．５～８．０または約７．６～７．７、７．６～７．８、７．６～７．９もしくは７．６～８．０の範囲である。

【０５２５】

いくつかの実施形態において、組成物または緩衝液のｐＨは、上述の範囲外のｐＨを有する組成物と比べて、ＨＲＳポリペプチドの１種または複数種の生化学的、物理学的および／または薬物動態学的性質を変更（例えば、改善、増加、減少、低下）する。特定の実施形態において、緩衝剤は、ヒスチジンであり、組成物のｐＨは、約７．０～７．５の範囲である。他の実施形態において、緩衝剤は、クエン酸緩衝剤であり、組成物のｐＨは、約６．５～７．５の範囲である。他の実施形態において、緩衝剤は、リン酸ナトリウム緩衝剤であり、組成物のｐＨは、約７．０～７．５の範囲である。

【０５２６】

例えば、ある特定の実施形態において、（ａ）ヒスチジン緩衝剤および約７．０～７．５のｐＨ、（ｂ）クエン酸緩衝剤および約６．５～７．５のｐＨまたは（ｃ）リン酸緩衝剤および約７．０～７．５のｐＨを含む組成物におけるＨＲＳポリペプチドは、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物と比べて増加した生物活性を有する。例示的な活性として、抗炎症性活性および抗体結合（例えば、抗Ｊｏ－１抗体への結合）を含む他の生物活性等、本明細書に記載されている非カノニカル活性のいずれかが挙げられる。いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍大きいまたは少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％大きい生物活性を有する。

【０５２７】

ある特定の実施形態において、（ａ）ヒスチジン緩衝剤および約７．０～７．５のｐＨ、（ｂ）クエン酸緩衝剤および約６．５～７．５のｐＨまたは（ｃ）リン酸緩衝剤および約７．０～７．５のｐＨを含む組成物におけるＨＲＳポリペプチドは、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍大きいまたは少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％大きい、増加した「安定性」（例えば、半減期により測定される）を有する。

【０５２８】

いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドの「安定性」は、その「機能的安定性」を含む、あるいはＨＲＳポリペプチドの少なくとも１種の生物活性が所定のセットの条件下において経時的に低下する速度を含む。例示的な生物活性として、例えば、抗Ｊｏ－１抗体と特異的に交差反応する少なくとも１個のエピトープの保持を含む、本明細書に記載されているカノニカルまたは非カノニカル活性のうちいずれか１種または複数が挙げられる。いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドの生物活性は、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００

倍遅いまたは少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度で低下する。

【０５２９】

ある特定の実施形態において、ＨＲＳポリペプチドの「安定性」は、所定のセットの条件下における経時的なそのアンフォールド速度を含む、その「動態学的安定性」または「熱安定性」を含む。ある特定の実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度でアンフォールドする。いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドの融解温度よりも、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％大きい融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０℃高い融解温度（T_m）を有する。

【０５３０】

いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドと比べて、改善または増加した均一性または単分散（例えば、単量体／オリゴマーの比、二量体／オリゴマーの比、単量体／二量体の比、二量体／単量体の比、還元条件下での鎖間ジスルフィド結合形成の比、見かけ上の分子量の分布、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥまたはＨＰＬＣ解析のいずれかにより検出される高分子量または低分子量ピークの低下）を有する。いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドの均一性または単分散は、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドと比べて、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍または少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％増加する。

【０５３１】

ある特定の実施形態において、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）におけるｐＨ範囲内のＨＲＳポリペプチド組成物は、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドと比べて、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による減少した高分子量ピーク（複数可）を有する。

【０５３２】

ある特定の実施形態において、上述のｐＨ範囲（ａ）、（ｂ）または（ｃ）におけるＨＲＳポリペプチド組成物は、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドと比べて、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による減少した低分子量ピーク（複数可）を有する。

【０５３３】

ある特定の実施形態において、上述のｐＨ範囲（ａ）、（ｂ）または（ｃ）におけるＨＲＳポリペプチド組成物は、上述の（ａ）、（ｂ）または（ｃ）における前記範囲外のｐＨを有する匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドと比べて、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、減少した濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５３４】

いくつかの実施形態において、組成物は、定義されたイオン強度、例えば、定義された濃度の塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）または他の塩を有する。例えば、組成物は、約５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０または４００ｍＭ（中間のあらゆる整数および範囲を含む）のＮａＣｌまたは他の塩を有し得る。いくつかの実施形態において、組成物は、約５０～３００、１００～３００、１５０～３００、２００～３００、２５０～３００、５０～２５０、１００～２５０、１５０～２５０、２００～２５０、５０～２００、１００～２００、１５０～２００、５０～１５０、１００～１５０または５０～１００ｍＭのＮａＣｌまたは他の塩を有する。ある特定の実施形態において、組成物は、高塩濃度、例えば、約または≧約１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、約または≧約２８０ｍＭ　ＮａＣｌを有する。

【０５３５】

いくつかの実施形態において、このような濃度または範囲のうちいずれか１種または複数におけるＮａＣｌの存在は、ＮａＣｌを含まない組成物と比べて、あるいは上述の量または範囲の外にあるＮａＣｌの濃度の組成物と比べて、ＨＲＳポリペプチドの１種または複数種の生化学的、物理学的および／または薬物動態学的性質を変更（例えば、改善、増加、減少、低下）する。ある特定の実施形態において、定義された濃度のＮａＣｌの存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、定義された濃度のＮａＣｌを含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度でアンフォールド、凝集または沈殿する。

【０５３６】

ある特定の実施形態において、ＮａＣｌの存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なく

とも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間、ＮａＣｌを含まないまたは上述の量もしくは範囲の外にある濃度のＮａＣｌを含むそれ以外の点では同一または匹敵する組成物においてインキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度でアンフォールド、凝集または沈殿する。

【０５３７】

いくつかの実施形態において、定義された濃度のＮａＣｌの存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、定義された濃度のＮａＣｌを含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドの融解温度よりも、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％大きい融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの実施形態において、定義された濃度のＮａＣｌの存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、定義された濃度のＮａＣｌを含まないまたは上述の量もしくは範囲の外にある濃度のＮａＣｌを含むそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０℃高い融解温度（T_m）を有する。ある特定の実施形態において、組成物は、上述の緩衝剤も含む。特定の実施形態において、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤である。他の実施形態において、緩衝剤は、クエン酸緩衝剤である。

【０５３８】

ある特定の実施形態において、ＨＲＳポリペプチド組成物は、約１４０ｍＭ～約２４０ｍＭの範囲の濃度のＮａＣｌを有し、ＮａＣｌを含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物において約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による減少した高分子量ピーク（複数可）を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、約１４０ｍＭ～約２８０ｍＭ　ＮａＣｌ、約７．０～７．５のｐＨを有するヒスチジン緩衝剤を含み、３７℃における２日間の貯蔵後に、主要ピークの約２％未満のＳＥ－ＨＰＬＣ解析による高分子量ピーク含量を有する。特定の態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における２日間の貯蔵後に、主要ピークの約１％未満の高分子量ピーク含量を有する。

【０５３９】

ある特定の実施形態において、ＨＲＳポリペプチド組成物は、約１４０ｍＭ～約２４０ｍＭの範囲の濃度のＮａＣｌを有し、ＮａＣｌを含まないまたは約１４０ｍＭ～約２４０ｍＭの外にある濃度のＮａＣｌを含むそれ以外の点では同一または匹敵する組成物において約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による減少した低分子量ピーク（複数可）を有する。

【０５４０】
ある特定の実施形態において、ＨＲＳポリペプチド組成物は、約１４０ｍＭ～約２４０ｍＭの範囲の濃度のＮａＣｌを有し、ＮａＣｌを含まないまたは約１４０ｍＭ～約２４０ｍＭの外にある濃度のＮａＣｌを含むそれ以外の点では同一または匹敵する組成物において約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、減少した濁度（Ａ３４０）を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、約１４０ｍＭ～約２８０ｍＭ　ＮａＣｌ、約７．０～７．５のｐＨを有するヒスチジン緩衝剤を含み、３７℃における２日間の貯蔵後に、約０．５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。特定の態様において、ＨＲＳ組成物は、３７Ｃにおける２日間の貯蔵後に、約０．０５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５４１】
いくつかの実施形態において、組成物は、１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤を含む。例示的な賦形剤として、スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、アルギニン、グリシンおよびグリセロールが挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態において、賦形剤は、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６、８．７、８．８、８．９、９．０、９．１、９．２、９．３、９．４、９．５、９．６、９．７、９．８、９．９、または１０％（ｗ／ｖ）（中間の全範囲を含む）で存在する。いくつかの実施形態において、賦形剤は、約０．１～５．０、０．１～４．５、０．１～４．０、０．１～３．５、０．１～３．０、０．１～２．５、０．１～２．０、０．１～１．５、０．１～１．０、０．１～０．５％（ｗ／ｖ）の範囲または約０．２～５．０、０．２～４．５、０．２～４．０、０．２～３．５、０．２～３．０、０．２～２．５、０．２～２．０、０．２～１．５、０．２～１．０、０．２～０．５％（ｗ／ｖ）の範囲または約０．５～５．０、０．５～４．５、０．５～４．０、０．５～３．５、０．５～３．０、０．５～２．５、０．５～２．０、０．５～１．５、０．５～１．０％（ｗ／ｖ）の範囲または約１．０～５．０、１．０～４．５、１．０～４．０、１．０～３．５、１．０～３．０、１．０～２．５、１．０～２．０、１．０～１．５％（ｗ／ｖ）の範囲または約１．５～５．０、１．５～４．５、１．５～４．０、１．５～３．５、１．５～３．０、１．５～２．５、１．５～２．０％（ｗ／ｖ）の範囲または約２．０～５．０、２．０～４．５、２．０～４．０、２．０～３．５、２．０～３．０、２．０～２．５％（ｗ／ｖ）の範囲または約２．５．０～５．０、２．５～４．５、２．５～４．０、２．５～３．５、２．５～３．０％（ｗ／ｖ）の範囲または約３．０～５．０、３．０～４．５、３．０～４．０、３．０～３．５％（ｗ／ｖ）の範囲または約３．５～５．０、３．５～４．５、３．５～４．０％（ｗ／ｖ）の範囲または約４．０～５．０、４．０～４．５もしくは４．５～５．０％（ｗ／ｖ）の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、賦形剤は、約５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０または４００ｍＭ（中間の全範囲

を含む）の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、賦形剤は、約５０～４００、１００～４００、１５０～４００、２００～４００、２５０～４００、３００～４００、３５０～４００、５０～３５０、１００～３５０、１５０～３５０、２００～３５０、２５０～３５０、３００～３５０、５０～３００、１００～３００、１５０～３００、２００～３００、２５０～３００、５０～２５０、１００～２５０、１５０～２５０、２００～２５０、５０～２００、１００～２００、１５０～２００、５０～１５０、１００～１５０または５０～１００ｍＭの濃度範囲で存在する。

【０５４２】

いくつかの実施形態において、１種または複数種の賦形剤の存在は、賦形剤（複数可）を含まない組成物と比べて、あるいは上述の量または範囲の外にある濃度の賦形剤（複数可）を含む組成物と比べて、ＨＲＳポリペプチドの１種または複数種の生化学的、物理学的および／または薬物動態学的性質を変更（例えば、改善、増加、減少、低下）する。ある特定の実施形態において、賦形剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、賦形剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度でアンフォールドする。いくつかの実施形態において、賦形剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、賦形剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドの融解温度よりも、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％大きい融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの実施形態において、賦形剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、賦形剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０℃高い融解温度（T_m）を有する。ある特定の実施形態において、組成物はまた、上述の緩衝剤を含み、必要に応じて、上述の定義された濃度のＮａＣｌを有する。特定の実施形態において、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤である。他の実施形態において、緩衝剤は、クエン酸緩衝剤である。

【０５４３】

ある特定の実施形態において、組成物は、１種または複数種の界面活性剤を含む。例示的な界面活性剤として、ポリソルベートおよびポロキサマーが挙げられるがこれらに限定されない。ポリソルベートは、脂肪酸によりエステル化されたペグ化ソルビタン（ソルビトールの誘導体）に由来する油性液体である。一部のポリソルベートは、Ａｌｋｅｓｔ（商標）、Ｃａｎａｒｃｅｌ（商標）およびＴｗｅｅｎ（商標）の商品名で販売されている。例示的なポリソルベートとして、ポリソルベート２０（ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート）、ポリソルベート４０（ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノパルミテート）、ポリソルベート６０（ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノステアレート）およびポリソルベート８０（ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノオレエート）が挙げられる。ポロキサマーは、２本のポリオキシエチレン（ポリ（エチレンオキシド））の親水性鎖に挟まれたポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中心疎水性鎖を含む非イオン性トリブロックコポリマーである。一部のポロキサマーは、Ｓｙｎｐｅｒｏｎｉｃｓ（商標）、Ｐｌｕｒｏｎｉｃｓ（商標）およびＫｏｌｌｉｐｈｏｒ（商標）の商品名で販売されている。ある特定の実施形態において、界面活性剤は、約０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８

、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９または３．０％（ｗ／ｖ）（中間の全範囲を含む）で存在する。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、約０．０１～３．０、０．０１～２．５、０．０１～２．０、０．０１～１．５、０．０１～１．０、０．０１～１．５、０．０１～１．０、０．０１～０．５、０．０１～０．１％（ｗ／ｖ）の範囲でまたは約０．０５～３．０、０．０５～２．５、０．０５～２．０、０．０５～１．５、０．０５～１．０、０．０５～１．５、０．０５～１．０、０．０５～０．５、０．０５～０．１％（ｗ／ｖ）の範囲でまたは約０．１～３．０、０．１～２．５、０．１～２．０、０．１～１．５、０．１～１．０、０．１～１．５、０．１～１．０、０．１～０．５％（ｗ／ｖ）の範囲でまたは約０．５～３．０、０．５～２．５、０．５～２．０、０．５～１．５、０．５～１．０、０．５～１．５、０．５～１．０％（ｗ／ｖ）の範囲でまたは約１．０～３．０、１．０～２．５、１．０～２．０、１．０～１．５％（ｗ／ｖ）の範囲でまたは約１．５～３．０、１．５～２．５、１．５～２．０％（ｗ／ｖ）の範囲でまたは約２．０～３．０、２．０～２．５％（ｗ／ｖ）の範囲でまたは約２．５～３．０％（ｗ／ｖ）の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、界面活性剤は、ポリソルベート２０（ＰＳ２０）である。ある特定の実施形態において、界面活性剤は、ポロキサマー、プルロニックＦ６８である。

【０５４４】

いくつかの実施形態において、１種または複数種の界面活性剤の存在は、界面活性剤（複数可）を含まない組成物と比べて、あるいは上述の量または範囲の外にある濃度の界面活性剤（複数可）を含む組成物と比べて、ＨＲＳポリペプチドの１種または複数種の生化学的、物理学的および／または薬物動態学的性質を変更（例えば、改善、増加、減少、低下）する。ある特定の実施形態において、界面活性剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、界面活性剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度でアンフォールド、凝集または沈殿する。

【０５４５】

ある特定の実施形態において、界面活性剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、界面活性剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物において約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２０、１４０、１６０、１８０もしくは２００倍遅いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％遅い速度でアンフォールド、凝集または沈殿する。

【０５４６】

いくつかの実施形態において、界面活性剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、界面活性剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドの融解温度よりも、少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％大きい融解温度（Ｔｍ）を有する。いくつかの実施形態において、界面活性剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチドは、界面活性剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一また

は匹敵する組成物における相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０℃高い融解温度（T_m）を有する。ある特定の実施形態において、組成物はまた、上述の緩衝剤を含み、必要に応じて、上述の定義された濃度のＮａＣｌを有し、必要に応じて、上述の１種または複数種の賦形剤を含む。特定の実施形態において、緩衝剤は、ヒスチジン緩衝剤である。他の実施形態において、緩衝剤は、クエン酸緩衝剤である。

【０５４７】

ある特定の実施形態において、界面活性剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチド組成物は、界面活性剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物において約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による減少した高分子量ピーク（複数可）を有する。

【０５４８】

いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、ＰＳ２０、約７．０～７．５のｐＨを有するヒスチジン緩衝剤および約１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含み、３７℃における７日間の貯蔵後に、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による主要ピークの約１％未満の高分子量ピーク含量を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、主要ピークの約０．５％未満の高分子量ピーク含量を有する。

【０５４９】

いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、ＰＳ８０、約７．０～７．５のｐＨを有するヒスチジン緩衝剤および約１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含み、３７℃における７日間の貯蔵後に、ＳＥ－ＨＰＬ解析による主要ピークの約２％未満の高分子量ピーク含量を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、主要ピークの約０．５％未満の高分子量ピーク含量を有する。

【０５５０】

いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、プルロニックＦ６８、約７．０～７．５のｐＨを有するヒスチジン緩衝剤および約１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含み、３７℃における７日間の貯蔵後に、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による主要ピークの約１％未満の高分子量ピーク含量を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、主要ピークの約０．５％未満の高分子量ピーク含量を有する。

【０５５１】

ある特定の実施形態において、界面活性剤（複数可）の存在下におけるＨＲＳポリペプチド組成物は、界面活性剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物において、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約３時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低いＳＥ－ＨＰＬＣ解析による減少した低分子量ピーク（複数可）を有する。

【０５５２】

ある特定の実施形態において、界面活性剤（複数可）におけるＨＲＳポリペプチド組成物は、界面活性剤（複数可）を含まないそれ以外の点では同一または匹敵する組成物にお

いて、約５℃またはおよそ室温（例えば、ほぼ２０～２５℃）または約３７℃で、約もしくは少なくとも約3時間または約もしくは少なくとも約３日間または約もしくは少なくとも約７日間インキュベートした場合の相当するＨＲＳポリペプチドよりも、少なくとも約１．５、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０倍低いまたは少なくとも約５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２００％、３００％、４００％もしくは５００％低い、減少した濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５５３】

いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、ＰＳ２０、約７．０～７．５のｐＨを有するヒスチジン緩衝剤および約１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含み、３７Ｃにおける７日間の貯蔵後に、約０．５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、約０．２未満の濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５５４】

いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、ＰＳ８０、約７．０～７．５のｐＨを有するヒスチジン緩衝剤および約１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含み、３７Ｃにおける７日間の貯蔵後に、約０．５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、約０．２未満の濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５５５】

いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、プルロニックＦ６８、約７．０～７．５のｐＨを有するヒスチジン緩衝剤および約１４０ｍＭ　ＮａＣｌを含み、３７℃における７日間の貯蔵後に、約０．５未満の濁度（Ａ３４０）を有する。いくつかの態様において、ＨＲＳ組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、約０．２未満の濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５５６】

ある特定の実施形態において、組成物は、１種または複数種の抗酸化剤化合物を含む。例示的な抗酸化剤として、システイン、メチオニン、Ｎ－アセチルシステイン（ＮＡＣ）およびグルタチオン、トコフェロール、カロテン（carotene）、ユビキノールおよびアスコルビン酸が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、抗酸化剤化合物は、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６、８．７、８．８、８．９、９．０、９．１、９．２、９．３、９．４、９．５、９．６、９．７、９．８、９．９、または１０ｍＭ（中間の全範囲を含む）の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、抗酸化剤化合物は、約０．１～５．０、０．１～４．５、０．１～４．０、０．１～３．５、０．１～３．０、０．１～２．５、０．１～２．０、０．１～１．５、０．１～１．０、０．１～０．５ｍＭの濃度範囲でまたは約０．２～５．０、０．２～４．５、０．２～４．０、０．２～３．５、０．２～３．０、０．２～２．５、０．２～２．０、０．２～１．５、０．２～１．０、０．２～０．５ｍＭの濃度範囲でまたは約０．５～５．０、０．５～４．５、０．５～４．０、０．５～３．５、０．５～３．０、０．５～２．５、０．５～２．０、０．５～１．５、０．５～１．０ｍＭの濃度範囲でまたは約１．０～５．０、１．０～４．５、１．０～４．０、１．０～３．５、１．０～３．０、１．０～２．５、１．０～２．０、１．０～１．５ｍＭの濃度範囲でまたは約１．５～５．０、１．５～４．５、１．５～４．０、１．５～３．５、１．５～３．０、１．５～２．５、１．５～２．０ｍＭの濃度範囲でまたは約２．０～５．０、２．０～４．５、２．０

～４．０、２．０～３．５、２．０～３．０、２．０～２．５ｍＭの濃度範囲でまたは約２．５．０～５．０、２．５～４．５、２．５～４．０、２．５～３．５、２．５～３．０ｍＭの濃度範囲でまたは約３．０～５．０、３．０～４．５、３．０～４．０、３．０～３．５ｍＭの濃度範囲でまたは約３．５～５．０、３．５～４．５、３．５～４．０ｍＭの濃度範囲でまたは約４．０～５．０、４．０～４．５もしくは４．５～５．０ｍＭの濃度範囲で存在する。

【０５５７】

いくつかの実施形態において、組成物は、キレート剤を含む。例示的なキレート剤として、エチレンジアミン四酢酸（ethylene diamine tetraacetate）（ＥＤＴＡ）、エチレングリコール四酢酸（ＥＧＴＡ）、１，２－ビス（ｏ－アミノフェノキシ）エタン－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＢＡＰＴＡ）および２，３－ジメルカプト－１－プロパンスルホン酸（ＤＭＰＳ）が挙げられるがこれらに限定されない。ある特定の実施形態において、キレート剤は、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９または５．０ｍＭ（中間の全範囲を含む）の濃度で存在する。いくつかの実施形態において、キレート剤は、約０．１～５．０、０．１～４．５、０．１～４．０、０．１～３．５、０．１～３．０、０．１～２．５、０．１～２．０、０．１～１．５、０．１～１．０、０．１～０．５ｍＭの濃度範囲でまたは約０．２～５．０、０．２～４．５、０．２～４．０、０．２～３．５、０．２～３．０、０．２～２．５、０．２～２．０、０．２～１．５、０．２～１．０、０．２～０．５ｍＭの濃度範囲でまたは約０．５～５．０、０．５～４．５、０．５～４．０、０．５～３．５、０．５～３．０、０．５～２．５、０．５～２．０、０．５～１．５、０．５～１．０ｍＭの濃度範囲でまたは約１．０～５．０、１．０～４．５、１．０～４．０、１．０～３．５、１．０～３．０、１．０～２．５、１．０～２．０、１．０～１．５ｍＭの濃度範囲でまたは約１．５～５．０、１．５～４．５、１．５～４．０、１．５～３．５、１．５～３．０、１．５～２．５、１．５～２．０ｍＭの濃度範囲でまたは約２．０～５．０、２．０～４．５、２．０～４．０、２．０～３．５、２．０～３．０、２．０～２．５ｍＭの濃度範囲でまたは約２．５．０～５．０、２．５～４．５、２．５～４．０、２．５～３．５、２．５～３．０ｍＭの濃度範囲でまたは約３．０～５．０、３．０～４．５、３．０～４．０、３．０～３．５ｍＭの濃度範囲でまたは約３．５～５．０、３．５～４．５、３．５～４．０ｍＭの濃度範囲でまたは約４．０～５．０、４．０～４．５もしくは４．５～５．０ｍＭの濃度範囲で存在する。

【０５５８】

いくつかの実施形態において、組成物および／またはそれに含有されるＨＲＳポリペプチド（複数可）は、高分子量凝集の程度（もしくは凝集体形成）、外観もしくは透明性（例えば、濁度、不透明度（opalescence））、均一性もしくは単分散の程度、溶解性、タンパク質純度、融解温度、タンパク質濃度および／またはタンパク質断片化の程度等、１種または複数種の絶対的物理学的性質によって特徴付けられる。

【０５５９】

ある特定の態様において、組成物は、存在するタンパク質総量と比べて約１０％またはそれ未満の凝集体含量を有する、あるいはいくつかの実施形態において、組成物は、約９％、８％、７％、６％もしくは５％またはそれ未満の凝集体含量を有する、あるいはいくつかの態様において、組成物は、約４％、３％もしくは２％またはそれ未満の凝集体含量を有する、あるいは特定の態様において、組成物は、約１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％もしくは０．１％またはそれ未満の凝集体含量を有する。いくつかの実施形態において、凝集体含量は、高分子量凝集体含量である。高分子量凝集体含量は、例えば、分子ふるいクロマトグラフィー（ＳＥ－ＨＰＬＣ）、動的光散乱、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

解析および分析的超遠心分離を含む、種々の分析技法により決定することができる。

【０５６０】

いくつかの態様において、組成物の外観は清澄であり、有意な粒子または繊維形成を欠く。組成物の透明性は、例えば、濁度、不透明度またはその両方によって特徴付けることができる。濁度は、Ａ３４０における吸光度によって測定することができ、不透明度は、Ａ５８０における吸光度によって測定することができる。いくつかの実施形態において、Ａ３４０における吸光度によって測定される組成物の濁度は、約１．０、０．９、０．８、０．７、０．６、０．５、０．４、０．３、０．２、０．１、０．０９、０．０８、０．０９、０．０７、０．０６、０．０５、０．０４、０．０３、０．０２、０．０１、０．００９、０．００８、０．００７、０．００６、０．００５、０．００４、０．００３、０．００２もしくは０．００１またはそれ未満である。ある特定の実施形態において、Ａ５８０における吸光度によって測定される組成物の不透明度は、約１．０、０．９、０．８、０．７、０．６、０．５、０．４、０．３、０．２、０．１、０．０９、０．０８、０．０９、０．０７、０．０６、０．０５、０．０４、０．０３、０．０２、０．０１、０．００９、０．００８、０．００７、０．００６、０．００５、０．００４、０．００３、０．００２もしくは０．００１またはそれ未満である。

【０５６１】

いくつかの態様において、組成物は、実質的に均質または単分散である１種または複数種のＨＲＳポリペプチドを含み、これは、例えば、分子ふるいクロマトグラフィー、動的光散乱、ＳＤＳ－ＰＡＧＥまたは分析的超遠心分離によって評定した場合、ＨＲＳポリペプチド組成物が、見かけ上の一分子量形態において実質的に（例えば、少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％以上）存在することを意味する。いくつかの態様において、ＨＲＳポリペプチドは、単量体として実質的に存在する。ある特定の態様において、ＨＲＳポリペプチドは、二量体として実質的に存在する。いくつかの態様において、係る組成物は、ジスルフィド結合形成を還元するためのＤＴＴまたは他の適した還元剤を含むことができる。

【０５６２】

ある特定の実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、静脈内投与、皮下投与等、特定の投与様式に望ましい溶解性を有する。望ましい溶解性の例として、約もしくは少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８もしくは９ｍｇ／ｍｌまたは約もしくは少なくとも約１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３もしくは２４ｍｇ／ｍｌまたは約もしくは少なくとも約２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８もしくは４９ｍｇ／ｍｌまたは約もしくは少なくとも約５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９もしくは６０ｍｇ／ｍｌが挙げられる。

【０５６３】

組成物は、いくつかの態様において、約または少なくとも約９０％のタンパク質基盤における純度（例えば、他の細胞タンパク質と比べたＨＲＳポリペプチド）を有する、あるいはいくつかの態様において、約または少なくとも約９５％、９６％、９７％または９８％のタンパク質基盤における純度を有する、あるいはいくつかの態様において、約または少なくとも約９９％または９９．５％のタンパク質基盤における純度を有する。純度は、当技術分野において公知のいずれかのルーチン分析方法により決定することができる。

【０５６４】

いくつかの態様において、所定の組成物におけるＨＲＳポリペプチドは、例えば、融解温度（Ｔｍ）によって特徴付けられる、定義された熱安定性を有する。いくつかの態様において、組成物におけるＨＲＳポリペプチドは、約または少なくとも約４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９または７０℃のＴｍを有する。ある特定の態様において、組成物におけるＨＲＳポリペプチドは、約４５～７０、４６～

７０、４７～７０、４８～７０、４９～７０、５０～７０、５１～７０、５２～７０、５３～７０、５４～７０、５５～７０、５６～７０、５７～７０、５８～７０、５９～７０、６０～７０、６１～７０、６２～７０、６３～７０、６４～７０、６５～７０、６６～７０、６７～７０、６８～７０もしくは６９～７０℃の範囲である、または約４５～６９、４６～６９、４７～６９、４８～６９、４９～６９、５０～６９、５１～６９、５２～６９、５３～６９、５４～６９、５５～６９、５６～６９、５７～６９、５８～６９、５９～６９、６０～６９、６１～６９、６２～６９、６３～６９、６４～６９、６５～６９、６６～６９、６７～６９、６８～６９℃の範囲である、または約４５～６８、４６～６８、４７～６８、４８～６８、４９～６８、５０～６８、５１～６８、５２～６８、５３～６８、５４～６８、５５～６８、５６～６８、５７～６８、５８～６８、５９～６８、６０～６８、６１～６８、６２～６８、６３～６８、６４～６８、６５～６８、６６～６８、６７～６８℃の範囲である、または約４５～６７、４６～６７、４７～６７、４８～６７、４９～６７、５０～６７、５１～６７、５２～６７、５３～６７、５４～６７、５５～６７、５６～６７、５７～６７、５８～６７、５９～６７、６０～６７、６１～６７、６２～６７、６３～６７、６４～６７、６５～６７、６６～６７℃の範囲である、または約４５～６６、４６～６６、４７～６６、４８～６６、４９～６６、５０～６６、５１～６６、５２～６６、５３～６６、５４～６６、５５～６６、５６～６６、５７～６６、５８～６６、５９～６６、６０～６６、６１～６６、６２～６６、６３～６６、６４～６６、６５～６６℃の範囲である、または約４５～６５、４６～６５、４７～６５、４８～６５、４９～６５、５０～６５、５１～６５、５２～６５、５３～６５、５４～６５、５５～６５、５６～６５、５７～６５、５８～６５、５９～６５、６０～６５、６１～６５、６２～６５、６３～６５、６４～６５℃の範囲である、または約４５～６４、４６～６４、４７～６４、４８～６４、４９～６４、５０～６４、５１～６４、５２～６４、５３～６４、５４～６４、５５～６４、５６～６４、５７～６４、５８～６４、５９～６４、６０～６４、６１～６４、６２～６４、６３～６４℃の範囲である、または約４５～６３、４６～６３、４７～６３、４８～６３、４９～６３、５０～６３、５１～６３、５２～６３、５３～６３、５４～６３、５５～６３、５６～６３、５７～６３、５８～６３、５９～６３、６０～６３、６１～６３、６２～６３℃の範囲である、または約４５～６２、４６～６２、４７～６２、４８～６２、４９～６２、５０～６２、５１～６２、５２～６２、５３～６２、５４～６２、５５～６２、５６～６２、５７～６２、５８～６２、５９～６２、６０～６２、６１～６２℃の範囲である、または約４５～６１、４６～６１、４７～６１、４８～６１、４９～６１、５０～６１、５１～６１、５２～６１、５３～６１、５４～６１、５５～６１、５６～６１、５７～６１、５８～６１、５９～６１、６０～６１℃の範囲である、または約４５～６０、４６～６０、４７～６０、４８～６０、４９～６０、５０～６０、５１～６０、５２～６０、５３～６０、５４～６０、５５～６０、５６～６０、５７～６０、５８～６０、５９～６０℃の範囲である、または約４５～５９、４６～５９、４７～５９、４８～５９、４９～５９、５０～５９、５１～５９、５２～５９、５３～５９、５４～５９、５５～５９、５６～５９、５７～５９、５８～５９℃の範囲である、または約４５～５８、４６～５８、４７～５８、４８～５８、４９～５８、５０～５８、５１～５８、５２～５８、５３～５８、５４～５８、５５～５８、５６～５８、５７～５８℃の範囲である、または約４５～５７、４６～５７、４７～５７、４８～５７、４９～５７、５０～５７、５１～５７、５２～５７、５３～５７、５４～５７、５５～５７、５６～５７℃の範囲である、または約４５～５６、４６～５６、４７～５６、４８～５６、４９～５６、５０～５６、５１～５６、５２～５６、５３～５６、５４～５６、５５～５６℃の範囲である、または約４５～５５、４６～５５、４７～５５、４８～５５、４９～５５、５０～５５、５１～５５、５２～５５、５３～５５、５４～５５℃の範囲である、または約４５～５４、４６～５４、４７～５４、４８～５４、４９～５４、５０～５４、５１～５４、５２～５４、５３～５４℃の範囲である、または約４５～５３、４６～５３、４７～５３、４８～５３、４９～５３、５０～５３、５１～５３、５２～５３℃の範囲である、または約４５～５２、４６～５２、４７～５２、４８～５２、４９

～５２、５０～５２、５１～５２℃の範囲である、または約４５～５１、４６～５１、４７～５１、４８～５１、４９～５１、５０～５１℃の範囲である、または約４５～５０、４６～５０、４７～５０、４８～５０、４９～５０℃の範囲である、または約４５～４９、４６～４９、４７～４９、４８～４９℃の範囲である、または約４５～４８、４６～４８、４７～４８、４５～４７、４６～４７もしくは４５～４６℃の範囲であるＴｍを有する。融解温度は、例えば、示差走査蛍光定量（ＤＳＦ）を含む種々の分析方法によって決定することができる。

【０５６５】

いくつかの態様において、ＨＲＳポリペプチドは、組成物において、定義されたタンパク質濃度で存在する。例えば、特定の組成物は、約もしくは少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５または１００ｍｇ／ｍｌのＨＲＳポリペプチド（複数可）の濃度を有する。一部の組成物は、約５～１００、１０～１００、１５～１００、２０～１００、２５～１００、３０～１００、３５～１００、４０～１００、４５～１００、５０～１００、５５～１００、６０～１００、７０～１００、８０～１００、９０～１００ｍｇ／ｍｌまたは約５～９０、１０～９０、１５～９０、２０～９０、２５～９０、３０～９０、３５～９０、４０～９０、４５～９０、５０～９０、５５～９０、６０～９０、７０～９０、８０～９０ｍｇ／ｍｌまたは約５～８０、１０～８０、１５～８０、２０～８０、２５～８０、３０～８０、３５～８０、４０～８０、４５～８０、５０～８０、５５～８０、６０～８０、７０～８０ｍｇ／ｍｌまたは約５～７０、１０～７０、１５～７０、２０～７０、２５～７０、３０～７０、３５～７０、４０～７０、４５～７０、５０～７０、５５～７０、６０～７０ｍｇ／ｍｌまたは約５～６０、１０～６０、１５～６０、２０～６０、２５～６０、３０～６０、３５～６０、４０～６０、４５～６０、５０～６０、５５～６０ｍｇ／ｍｌまたは約５～５０、１０～５０、１５～５０、２０～５０、２５～５０、３０～５０、３５～５０、４０～５０、４５～５０ｍｇ／ｍｌまたは約５～４５、１０～４５、１５～４５、２０～４５、２５～４５、３０～４５、３５～４５、４０～４５ｍｇ／ｍｌまたは約５～４０、１０～４０、１５～４０、２０～４０、２５～４０、３０～４０、３５～４０ｍｇ／ｍｌまたは約５～３５、１０～３５、１５～３５、２０～３５、２５～３５、３０～３５ｍｇ／ｍｌまたは約５～３０、１０～３０、１５～３０、２０～３０、２５～３０ｍｇ／ｍｌまたは約５～２５、１０～２５、１５～２５、２０～２５、５～２０、１０～２０、１５～２０、５～１５、１０～１５もしくは５～１０ｍｇ／ｍｌタンパク質の範囲であるＨＲＳポリペプチド（複数可）の濃度を有する。

【０５６６】

ある特定の態様において、組成物は、存在するタンパク質の総量と比べて約１０％未満のタンパク質断片化の程度を有する、あるいはいくつかの実施形態において、組成物は、約９％、８％、７％、６％または５％未満のタンパク質断片化の程度を有する、あるいはいくつかの態様において、組成物は、約４％、３％または２％未満のタンパク質断片化の程度を有する、あるいは特定の態様において、組成物は、約１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％または０．１％未満のタンパク質断片化の程度を有する。タンパク質断片化は、例えば、分子ふるいクロマトグラフィー、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析および分析的超遠心分離を含む、種々の分析技法によって測定することができる。

【０５６７】

特定の実施形態において、治療用組成物は、少なくとも１種の実質的に純粋なＨＲＳポリペプチドを必要に応じて少なくとも約１０～５０ｍｇ／ｍｌの濃度で含み、約４０～５０ｍＭヒスチジン（例えば、Ｌ－ヒスチジン）、約１４０～２４０ｍＭ　ＮａＣｌ、約１～２％トレハロース、約０．２０～０．０５％ポリソルベート２０（ＰＳ２０）を含み、

約７．０～７．５のｐＨを有し、実質的にエンドトキシンを含まない。いくつかの態様において、治療用組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による主要ピークの約１％未満の高分子量ピーク含量によって特徴付けられる。いくつかの態様において、治療用組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による主要ピークの約０．５％未満の高分子量ピーク含量を有する。いくつかの態様において、治療用組成物は、３７Ｃにおける７日間の貯蔵後に、約０．５未満の濁度（Ａ３４０）によって特徴付けられる。いくつかの態様において、治療用組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、約０．２未満の濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５６８】

他の実施形態において、組成物は、少なくとも１種の実質的に純粋なＨＲＳポリペプチドを必要に応じて少なくとも約１０～５０ｍｇ／ｍｌの濃度で含み、約４０～５０ｍＭヒスチジン（例えば、Ｌ－ヒスチジン）、約１４０～２４０ｍＭ　ＮａＣｌ、約１～２％スクロース、約０．０１～０．０５％ポリソルベート２０（ＰＳ２０）を含み、約７．３のｐＨを有し、実質的にエンドトキシンを含まない。いくつかの態様において、治療用組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による主要ピークの約１％未満の高分子量ピーク含量によって特徴付けられる。いくつかの態様において、治療用組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、ＳＥ－ＨＰＬＣ解析による主要ピークの約０．５％未満の高分子量ピーク含量を有する。いくつかの態様において、治療用組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、約０．５未満の濁度（Ａ３４０）によって特徴付けられる。いくつかの態様において、治療用組成物は、３７℃における７日間の貯蔵後に、約０．２未満の濁度（Ａ３４０）を有する。

【０５６９】

ある特定の実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２もしくは１７６～１８２または表１～９のいずれかに収載されているもしくはそれに由来し得るＨＲＳポリペプチド（これらのバリアントを含む）のいずれかを含む、それからなるまたはそれから本質的になる。いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、組成物において少なくとも約５８、５９、６０または６１℃のＴｍを有する、ＨＲＳ（１～５０６）もしくはＨＲＳ（２～５０６）またはこれらのバリアントである。

【０５７０】

本明細書に記載されているＨＲＳポリペプチド組成物の生化学的、物理学的および／または薬物動態学的性質は、温度、ｐＨまたは他の条件等、いずれかの定義されたセットの条件下において、必要に応じていずれか所定の時点でまたはある期間にわたり、特徴付けることができる。例えば、ある特定の実施形態において、係る性質は、約－８０、－６０、－４０、－２０、－１０、－５、－４、－３、－２０、－２、－１、０、１、２、３、４、５、６、７、８、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９９または１００℃（中間のあらゆる整数および範囲を含む）の温度において特徴付けられる。いくつかの実施形態において、係る性質は、およそ室温（例えば、２０～２５℃）にて特徴付けられる。係る性質は、ある期間にわたって、例えば、約０．２５、０．５、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３もしくは２４時間の期間にわたってまたは約０．１、０．２５、０．５、０．７５、１、１．５、２、２．５、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４日間の期間にわたってまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０もしくは２４週間または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１もしくは１２ヶ月間ほどにわたって特徴付けることもできる。いくつかの実施形態において、係る性質は、組成物を少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０回以上凍結融解した後に特徴付けられる。

【０５７１】
医薬組成物は、ＨＲＳポリペプチドの薬学的に許容される塩を含むことができる。適した塩の総説に関して、Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth（Wiley-VCH、２００２年）を参照されたい。適した塩基塩は、無毒性塩を生成する塩基から生成される。代表例として、アルミニウム、アルギニン、ベンザチン、カルシウム、コリン、ジエチルアミン、ジオラミン（diolamine）、グリシン、リシン、マグネシウム、メグルミン、オラミン（olamine）、カリウム、ナトリウム、トロメタミンおよび亜鉛塩が挙げられる。酸および塩基のヘミ塩（hemisalt）、例えば、ヘミ硫酸塩（hemisulphate）およびヘミカルシウム（hemicalcium）塩も生成され得る。非経口的投与に適した本発明において使用するべき組成物は、好ましくは、レシピエントの血液と等張性になるよう、一般に、塩化ナトリウム、グリセリン、グルコース、マンニトール、ソルビトールその他を使用して作製された、薬学的活性成分の無菌水溶液および／または懸濁液を含むことができる。薬学的に許容される酸付加塩の生成に適した有機酸の限定することのない例として、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、ヘキサン酸、シクロペンタンプロピオン酸、グリコール酸、シュウ酸、ピルビン酸、乳酸、マロン酸、コハク酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、パルミチン酸、安息香酸、３－（４－ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、アルキルスルホン酸（例えば、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、１，２－エタン－ジスルホン酸、２－ヒドロキシエタンスルホン酸等）、アリールスルホン酸（例えば、ベンゼンスルホン酸、４－クロロベンゼンスルホン酸、２－ナフタレンスルホン酸、４－トルエンスルホン酸、カンファースルホン酸等）、４－メチルビシクロ（２．２．２）－オクター２－エン－１－カルボン酸、グルコヘプトン酸、３－フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、第三級ブチル酢酸、ラウリル硫酸、グルコン酸、グルタミン酸、ヒドロキシナフトエ酸、サリチル酸、ステアリン酸、ムコン酸その他が挙げられる。

【０５７２】
特定の実施形態において、担体は、水を含むことができる。いくつかの実施形態において、担体は、生理食塩水溶液、例えば、生理的ｐＨにおける生理的濃度のナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよび塩化物を含有する水となり得る。いくつかの実施形態において、担体は、水となることができ、製剤は、ＮａＣｌをさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、製剤は、等張性となり得る。いくつかの実施形態において、製剤は、低張性となり得る。他の実施形態において、製剤は、高張性となり得る。いくつかの実施形態において、製剤は、等浸透圧性となり得る。いくつかの実施形態において、製剤は、ポリマー（例えば、ゲル形成ポリマー、ポリマー性粘性増強剤等）を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、製剤は、粘性増加剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、ポリアニオン系ポリマー等）を実質的に含まない。いくつかの実施形態において、製剤は、ゲル形成ポリマーを実質的に含まない。いくつかの実施形態において、製剤の粘性は、同一濃度のＨＲＳポリペプチド（またはその薬学的に許容される塩）を含有する生理食塩水溶液の粘性とほぼ同一である。

【０５７３】
本発明の医薬組成物において、薬学的に許容される賦形剤および担体溶液の製剤は、種々の処置レジメンにおける本明細書に記載されている特定の組成物の使用に適した投薬および処置レジメンの開発の通り、当業者に周知のものであり、例えば、経口、非経口的、静脈内、鼻腔内および筋肉内投与および製剤を含む。

【０５７４】
特定の用途において、本明細書に開示されている医薬組成物は、経口投与により被験体へと送達することができる。そのようなものとして、これらの組成物は、不活性希釈液または同化できる可食担体を用いて製剤化することができる、あるいは硬または軟殻ゼラチンカプセルに封入することができる、あるいは錠剤へと圧縮することができる、あるいは食事中の食物により直接的に取り込むことができる。

【０５７５】

ＨＲＳポリペプチドの送達に適した医薬組成物およびその調製のための方法は、当業者であれば容易に明らかとなるであろう。係る組成物およびその調製のための方法は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第１９版（Mack Publishing Company、１９９５年）に見出すことができる。

【０５７６】

治療用量のＨＲＳポリペプチドの投与は、例えば、経口、直腸、鼻腔内投与や、硝子体内、結膜下（subconjuctival）、テノン嚢下（sub-tenon）、眼球後、上脈絡膜静脈内、動脈内、腹腔内、くも膜下腔内、脳室内（intraventricular）、尿道内、胸骨内、頭蓋内、筋肉内、滑膜内、眼内、局所的および皮下を含む非経口的投与を含む、薬用技術分野において公知の適した方法によるものとなり得る。非経口的投与に適した装置は、有針（マイクロニードルを含む）注射器、無針注射器および注入技法を含む。

【０５７７】

非経口的製剤は、典型的には、塩、炭水化物および緩衝剤（好ましくは、３～９のｐＨとなる）等、賦形剤を含有し得る水溶液であるが、一部の適用のため、無菌、実質的にパイロジェンフリーまたはパイロジェンフリー水等、適したビヒクルと併せて使用されるための無菌非水性溶液または乾燥形態としてより適切に製剤化することができる。例えば、凍結乾燥による無菌条件下における非経口的製剤の調製は、当業者に周知の標準医薬品技法を使用して容易に達成することができる。

【０５７８】

非経口的投与のための製剤は、即時および／または持続放出となるよう製剤化することができる。持続放出組成物は、遅延、修飾、パルス（pulsed）、制御、標的およびプログラム放出を含む。よって、ＨＲＳポリペプチドは、懸濁液もしくは固体、半固体、またはＨＲＳポリペプチドの持続放出を達成する植え込み式デポーとして投与するためのチキソトロピー液体として製剤化することができる。係る製剤の例として、薬物コーティングされたステント、ならびに薬物ローディングされたポリ（ＤＬ－乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＧＬＡ）、ポリ（ＤＬ－ラクチド－ｃｏ－グリコリド）（ＰＬＧ）またはポリ（ラクチド）（ＰＬＡ）層状小胞またはマイクロ粒子、ハイドロゲルを含む半固体および懸濁液（Hoffman AS: Ann. N.Y. Acad. Sci.９４４巻：６２～７３頁（２００１年））、Ｆｌａｍｅｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ.により開発されたＭｅｄｕｓａシステム等、ポリ－アミノ酸ナノ粒子システム、Ａｔｒｉｘ，Ｉｎｃ.により開発されたＡｔｒｉｇｅｌ等、非水性ゲルシステム、ならびにＤｕｒｅｃｔ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎにより開発されたＳＡＢＥＲ（スクロースアセテートイソブチレート徐放（Sucrose Acetate Isobutyrate Extended Release））、ならびにＳｋｙｅＰｈａｒｍａにより開発されたＤｅｐｏＦｏａｍ等、脂質ベースのシステムが挙げられるがこれらに限定されない。

【０５７９】

上に記す通り、遊離塩基または薬理学的に許容される塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０）またはプルロニックＦ６８等、界面活性剤と適切に混合された水において調製することができる。分散は、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびこれらの混合物においてならびに油において調製することもできる。貯蔵および使用の通常の条件下において、これらの調製物は、微生物の生育を防止するための保存料を含有する。

【０５８０】

注射用の使用に適した医薬品形態は、無菌水溶液または分散、および無菌注射用溶液または分散の即時調製のための無菌粉末を含む（特にここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する米国特許第５，４６６，４６８号）。あらゆる事例において、形態は、無菌となるべきであり、容易に注射器使用できる（syringability）程度まで流体となるべきである。これは、製造および貯蔵の条件下で安定的となるべきであり、細菌および真菌等、微生物の汚染作用から保存されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエ

チレングリコールその他）、これらの適した混合物および／または植物油を含有する溶媒または分散媒を含むことができる。妥当な流動性は、例えば、レシチン等、コーティングの使用により、分散の場合は要求される粒子サイズの維持によりおよび界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールその他により容易となり得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましくなるであろう。注射用組成物の延長された吸収は、組成物における、吸収を遅延する薬剤、例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチンの使用によりもたらすことができる。

【０５８１】

例えば、水溶液における非経口的投与のため、溶液は、必要であれば適切に緩衝されるべきであり、液体希釈液は先ず、十分な生理食塩水またはグルコースにより等張性にされる。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、用いることのできる無菌水性培地は、本開示を踏まえると当業者には公知であろう。例えば、１投薬量は、１ｍｌの等張性ＮａＣｌ溶液に溶解して、１０００ｍｌの皮下点滴療法液に加える、あるいは提案された注入部位に注射することができる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第１５版、１０３５～１０３８頁および１５７０～１５８０頁を参照されたい）。投薬量において、処置されている被験体の状態に応じて、ある程度の変動が必然的に生じるであろう。投与の責任者は、いかなる場合においても、個々の被験体に適切な用量を決定するであろう。さらに、ヒト投与のために、調製物は、無菌性、発熱性および一般的な安全性およびＦＤＡ生物製剤事務局の標準に要求される純度標準を満たすべきである。

【０５８２】

無菌注射用溶液は、要求に応じて上に列挙する様々な他の成分を有する適切な溶媒に、要求された量の活性化合物を取り込み、続いて濾過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散は、様々な滅菌活性成分を、基礎的分散媒および上に列挙する成分由来の要求される他の成分を含有する無菌ビヒクルに取り込むことにより調製される。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥およびフリーズドライ技法であり、これら技法は、先に無菌濾過したその溶液に由来する活性成分プラスいずれかの追加的な所望の成分の粉末を生じる。

【０５８３】

本明細書に開示されている組成物は、中性または塩形態で製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基により生成）を含み、これは、例えば、塩酸もしくはリン酸等の無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸その他等の有機酸により生成される。遊離カルボキシル基により生成される塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化第二鉄等の無機塩基およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインその他等の有機塩基に由来し得る。製剤化した後、溶液は、投薬製剤と適合性の様式で、治療的に有効となるような量で投与されるであろう。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセルその他等、種々の剤形において容易に投与される。

【０５８４】

本明細書において使用される場合、「担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈液、抗細菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、賦形剤、イオン強度修飾因子、界面活性剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁液、コロイドその他を含む。医薬品活性物質のための係る培地および薬剤の使用は、当技術分野において周知のものである。いかなる従来の培地または薬剤も、活性成分と不適合性である場合を除き、治療用組成物におけるその使用が考慮される。補足的活性成分を組成物に取り込むこともできる。

【０５８５】

語句「薬学的に許容される」は、ヒトに投与された際にアレルギー性または類似の不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。活性成分としてタンパク質を含有する

水性組成物の調製は、当技術分野において十分に理解されている。典型的には、係る組成物は、液体の溶液または懸濁液のいずれかとして、注射用として調製される。注射前に液体に溶解または懸濁するのに適した固体形態を調製することもできる。調製物は、乳化することもできる。

【０５８６】

製剤化の方法は、当技術分野において周知のものであり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、Mack Publishing Company、Easton、Pa.、第１９版（１９９５年）に開示されている。本明細書に提示されている組成物および薬剤は、本発明の方法に従って、いずれかの治療的に有効な投薬レジメンにおいて投与することができる。投薬量および頻度は、有害効果のない有効レベルの薬剤を作製するために選択される。本発明の化合物の有効量は、投与経路、処置されている温血動物の種類および検討中の特異的温血動物の身体的特徴に依存するであろう。この量を決定するためのこれらの因子およびそれらの関係性は、医学技術分野における熟練の医師に周知のものである。この量および投与方法は、最適の効力を達成するために目的に合わせることができるが、体重、食事、同時的薬物療法および医学分野の当業者が認識するであろう他の因子等の因子に依存するであろう。

【０５８７】

ある特定の実施形態において、医薬組成物は、鼻腔内スプレー、吸入および／または他のエアロゾル送達ビヒクルにより送達することができる。遺伝子、ポリヌクレオチドおよびペプチド組成物を、経鼻エアロゾルスプレーにより肺に直接的に送達するための方法は、例えば、米国特許第５，７５６，３５３号および米国特許第５，８０４，２１２号（それぞれ特にここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する）に記載されている。同様に、鼻腔内マイクロ粒子樹脂（Takenagaら、１９９８年）およびリゾホスファチジル－グリセロール化合物（米国特許第５，７２５，８７１号、特にここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する）を使用する薬物の送達もまた、医薬品技術分野において周知のものである。同様に、ポリテトラフルオロエチレン（polytetrafluoroetheylene）支持マトリックスの形態における経粘膜的薬物送達は、米国特許第５，７８０，０４５号（特にここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する）に記載されている。

【０５８８】

ある特定の実施形態において、送達は、適した宿主細胞への本発明の組成物の導入のためのリポソーム、ナノカプセル、マイクロ粒子、マイクロスフェア、脂質粒子、小胞その他の使用により行うことができる。特に、本発明の組成物は、脂質粒子、リポソーム、小胞、ナノスフェア、ナノ粒子その他にカプセル包埋された送達のために製剤化することができる。係る送達ビヒクルの製剤化および使用は、公知および従来の技法を使用して行うことができる。

【０５８９】

ある特定の実施形態において、本明細書に提示されている薬剤は、ポリマーおよびマトリックス等、生体適合性および生分解性基板を含む薬学的に許容される固体基板に付着させることができる。係る固体基板の例として、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸およびγ－エチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン－酢酸ビニル、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール酸）（ＰＬＧＡ）およびＬＵＰＲＯＮ　ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよび酢酸リュープロリドで構成された注射用マイクロスフェア）等の分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、ポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸、コラーゲン、金属、ヒドロキシアパタイト、バイオガラス、アルミネート（aluminate）、バイオセラミック材料ならびに精製タンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。

【０５９０】

特定の一実施形態において、固体基板は、Ａｔｒｉｇｅｌ（登録商標）（ＱＬＴ、Ｉｎ

ｃ．、Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ、Ｂ．Ｃ．）の商品名で販売されているもの等、生分解性ポリマーを含む。Ａｔｒｉｇｅｌ（登録商標）薬物送達系は、生体適合性担体に溶解された生分解性ポリマーからなる。医薬品は、製造時にこの液体送達系にブレンドすることができる、あるいは製品によっては、使用時に医者によって後に加えることができる。液体製品が、小ゲージ針によって皮下空間に注射される、あるいはカニューレによって到達できる組織部位に置かれる場合、組織液中の水は、ポリマーを沈殿させ、固体インプラント中に薬物を捕捉する。続いて、インプラント内にカプセル包埋された薬物は、ポリマーマトリックスが時間と共に生分解するにつれて、制御された様式で放出される。

【０５９１】

特定の実施形態において、投与されるＨＲＳ組成物または薬剤の量は、一般に、経口または静脈内投与された場合、投薬量約０．１～約１００ｍｇ／ｋｇ／日、典型的には、約０．１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲であろう。特定の実施形態において、投薬量は、１ｍｇ／ｋｇまたは５．０ｍｇ／ｋｇである。ヒトに関して、使用される一日投薬量は、約０．１ｍｇ／ｋｇ～０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ、約１０ｍｇ／ｋｇ～２０ｍｇ／ｋｇ、約２０ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇ、約３０ｍｇ／ｋｇ～５０ｍｇ／ｋｇおよび約５０ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ／２４時間の範囲であり得る。

【０５９２】

ある特定の実施形態において、組成物または薬剤は、０．１～１０ｍｇ／ｋｇまたは０．５～１５ｍｇ／ｋｇの単一投薬量で投与される。他の実施形態において、組成物または薬剤は、０．１～１ｍｇ／ｋｇ／日、０．５～２ｍｇ／ｋｇ／日または５～２０ｍｇ／ｋｇ／日または約２０～８０ｍｇ／ｋｇ／日または約８０～１５０ｍｇ／ｋｇ／日の投薬量で投与される。

【０５９３】

様々な実施形態において、投薬量は、１日当たり約５０～２５００ｍｇ、１００～２５００ｍｇ／日、３００～１８００ｍｇ／日または５００～１８００ｍｇ／日である。一実施形態において、投薬量は、約１００～６００ｍｇ／日の間である。別の一実施形態において、投薬量は、約３００～１２００ｍｇ／日の間である。特定の実施形態において、組成物または薬剤は、１日当たり１または複数の用量で（即ち、用量の組合せが、所望の一日投薬量を達成する場合）、１００ｍｇ／日、２４０ｍｇ／日、３００ｍｇ／日、６００ｍｇ／日、１０００ｍｇ／日、１２００ｍｇ／日または１８００ｍｇ／日の投薬量で投与される。関連する実施形態において、投薬量は、２００ｍｇ　ｂｉｄ、３００ｍｇ　ｂｉｄ、４００ｍｇ　ｂｉｄ、５００ｍｇ　ｂｉｄ、６００ｍｇ　ｂｉｄまたは７００ｍｇ　ｂｉｄ、８００ｍｇ　ｂｉｄ、９００ｍｇ　ｂｉｄまたは１０００ｍｇ　ｂｉｄである。様々な実施形態において、組成物または薬剤は、単一または反復投薬において投与される。初回投薬量およびその後の投薬量は、同一であっても異なってもよい。

【０５９４】

いくつかの実施形態において、投与される総用量は、約０．００１ｍｇ、約０．００５ｍｇ、約０．０１ｍｇ、約０．０５ｍｇ、約０．１ｍｇ、０．５ｍｇ、約１ｍｇ、約２ｍｇ、約３ｍｇ、約４ｍｇ、約５ｍｇ、約６ｍｇ、約７ｍｇ、約８ｍｇ、約９ｍｇ、約１０ｍｇ、約２０ｍｇ、約３０ｍｇ、約４０ｍｇ、約５０ｍｇ、約６０ｍｇ、約７０ｍｇ、約８０ｍｇ、約９０ｍｇ、約１００ｍｇ、約５００ｍｇ、１，０００ｍｇ、約２，０００ｍｇ、約３，０００ｍｇ、約４，０００ｍｇ、約５，０００ｍｇ、約６，０００ｍｇ、約７，０００ｍｇ、約８，０００ｍｇ、約９，０００ｍｇ、約１０，０００ｍｇ／投薬間隔（例えば、２４時間毎）となり得る。いくつかの実施形態において、投薬間隔は、１日に１回、２日に１回、３日に１回、４日に１回、５日に１回、１週間に１回または２週間に１回となり得る。数日間以上にわたる反復投与のため、状態に応じて、処置は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。上述および他の治療法（例えば、ｅｘ　ｖｉｖｏ療法）の進行は、従来の方法およびアッセイにより、ならびに医者または他の当業者に公知の判断基準に基づき容易にモニターすることができる。

【０５９５】
持続的な送達装置および組成物のために、係る送達系に含有されるＨＲＳの総用量は、持続放出系の放出プロファイルに応じて、対応してより大きくなるであろうことがさらに認められよう。よって、５日間の期間にわたるＨＲＳポリペプチドの送達に企図される持続放出組成物または装置は、典型的には、ＨＲＳポリペプチドの一日用量の少なくとも約５～１０倍を含むであろう。３６５日間の期間にわたるＨＲＳペプチドの送達に企図される持続放出組成物または装置は、典型的には、ＨＲＳポリペプチドの一日用量の少なくとも約４００～８００倍を含むであろう（持続放出系を用いて投与される場合、ＨＲＳポリペプチドの安定性およびバイオアベイラビリティに依存する）。

【０５９６】
ある特定の実施形態において、組成物または薬剤は、例えば、およそ、例えば、１０分間～９０分間の期間にわたる注入により静脈内投与される。他の関連する実施形態において、組成物または薬剤は、例えば、ある期間にわたり約０．１～約１０ｍｇ／ｋｇ／時間の間の投薬量で、継続的注入により投与される。期間は変動し得るが、ある特定の実施形態において、期間は、約１０分間～約２４時間の間または約１０分間～約３日間の間となり得る。

【０５９７】
特定の実施形態において、有効量または治療有効量は、約０．１μｇ／ｍｌ～約２０μｇ／ｍｌの間または約０．３μｇ／ｍｌ～約２０μｇ／ｍｌの間のC_{max}により、被験体の血漿における組成物または薬剤の総濃度を達成するのに十分な量である。ある特定の実施形態において、経口投薬量は、約０．１μｇ／ｍｌ～約５μｇ／ｍｌの間または約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間の血漿中濃度（C_{max}）を達成するのに十分な量である。ある特定の実施形態において、静脈内投薬量は、約１μｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間または約２μｇ／ｍｌ～約６μｇ／ｍｌの間の血漿中濃度（C_{max}）を達成するのに十分な量である。関連する一実施形態において、被験体の血漿における薬剤の総濃度は、約２０μｇ／ｍｌ未満の平均トラフ濃度および／または約２０μｇ／ｍｌ未満の定常状態濃度を有する。さらに別の一実施形態において、被験体の血漿における薬剤の総濃度は、約１０μｇ／ｍｌ未満の平均トラフ濃度および／または約１０μｇ／ｍｌ未満の定常状態濃度を有する。

【０５９８】
さらにまた別の一実施形態において、被験体の血漿における薬剤の総濃度は、約１ｎｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間の平均トラフ濃度および／または約１ｎｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間の定常状態濃度を有する。一実施形態において、被験体の血漿における薬剤の総濃度は、約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間の平均トラフ濃度および／または約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間の定常状態濃度を有する。

【０５９９】
特定の実施形態において、組成物または薬剤は、哺乳動物において、約１ｎｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間の平均トラフ濃度および／または約１ｎｇ／ｍｌ～約１０μｇ／ｍｌの間の定常状態濃度を有する血漿中濃度を達成するのに十分な量で投与される。関連する実施形態において、哺乳動物の血漿における薬剤の総濃度は、約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間の平均トラフ濃度および／または約０．３μｇ／ｍｌ～約３μｇ／ｍｌの間の定常状態濃度を有する。

【０６００】
本発明の特定の実施形態において、組成物もしくは薬剤の有効量または組成物もしくは薬剤の血漿中濃度は、例えば、少なくとも１５分間、少なくとも３０分間、少なくとも４５分間、少なくとも６０分間、少なくとも９０分間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも８時間、少なくとも１２時間、少なくとも２４時間、少なくとも４８時間、少なくとも３日間、少なくとも４日間、少なくとも５日間、少なくとも６日間、少なくとも１週間、少なくとも２週間、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、少なくとも１年間、少なくとも２年

間または２年間を超えて達成または維持される。

【０６０１】

ある特定の実施形態において、投与されるポリペプチドの量は、典型的には、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約１５ｍｇ／ｋｇまたは約１５ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ患者体重の範囲内であろう。疾患の種類および重症度に応じて、例えば、１回または複数の別々の投与によるものであれ、継続的注入によるものであれ、約０．１μｇ／ｋｇ～約０．１ｍｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ体重（例えば、約０．１～１５ｍｇ／ｋｇ／用量）のポリペプチドが、患者投与の初回候補投薬量となり得る。例えば、投薬レジメンは、約４ｍｇ／ｋｇのポリペプチドの初回負荷用量、続いて約２ｍｇ／ｋｇの毎週の維持用量、あるいは約半分の負荷用量の投与を含むことができる。しかし、他の投薬量レジメンも有用となり得る。典型的な一日投薬量は、上述の因子に応じて、約０．１ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上に及び得る。数日間以上にわたる反復投与のため、状態に応じて、処置は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。特定の実施形態において、有効投薬量は、本明細書に記載されている組成物または薬剤の血漿レベルまたは平均トラフ濃度を達成する。これらは、ルーチン手順を使用して容易に決定することができる。

【０６０２】

特定の実施形態において、有効投薬量は、本明細書に記載されている組成物または薬剤の血漿レベルまたは平均トラフ濃度を達成する。これらは、ルーチン手順を使用して容易に決定することができる。

【０６０３】

いくつかの実施形態において、例えば、組成物は、ワクチンとして治療用免疫原性組成物を用いる場合、１種または複数種のアジュバントを含むこともできる。アジュバントは、免疫応答（例えば、ＣＴＬおよびヘルパーＴ（$Ｔ_{Ｈ}$）細胞により媒介される抗原に対する免疫応答）を非特異的に増強または高める物質であり、よって、本発明の治療用組成物において有用であると考慮されるであろう。適したアジュバントとして、１０１８　ＩＳＳ、アルミニウム塩、Ａｍｐｌｉｖａｘ、ＡＳ１５、ＢＣＧ、ＣＰ－８７０，８９３、ＣｐＧ７９０９、ＣｙａＡ、ｄＳＬＩＭ、フラゲリンまたはフラゲリンに由来するＴＬＲ５リガンド、ＦＬＴ３リガンド、ＧＭ－Ｃ　ＳＦ、ＩＣ３０、ＩＣ３１、イミキモド（ＡＬＤＡＲＡ）、ＩｍｕＦａｃｔ　ＩＭＰ３２１、インターフェロン－アルファもしくは－ベータまたはこれらのペグ化誘導体、ＩＳ　Ｐａｔｃｈ、ＩＳＳ、ＩＳＣＯＭＡＴＲＩＸ、ＩＳＣＯＭｓ、Ｊｕｖｌｍｍｕｎｅ、ＬｉｐｏＶａｃ、ＭＡＬＰ２、ＭＦ５９、モノホスホリルリピドＡ、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＭＳ　１３１２、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　２０６、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ　５０Ｖ、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ　ＩＳＡ－５１、油中水型および水中油型エマルション、ＯＫ－４３２、ＯＭ－１７４、ＯＭ－１９７－ＭＰ－ＥＣ、ＯＮＴＡＫ、ＯｓｐＡ、ＰｅｐＴｅｌ（登録商標）ベクター系、ＰＬＧマイクロ粒子、レシキモド（resiquimod）、ＳＲＬ１７２、ビロソームおよび他のウイルス様粒子、ＹＦ－１７Ｄ、ＶＥＧＦトラップ、Ｒ８４８、ベーターグルカン、Ｐａｍ３Ｃｙｓ、サポニンに由来するＡｑｕｉｌａのＱＳ２１　ｓｔｉｍｕｌｏｎ、マイコバクテリアエキスおよび合成細菌細胞壁模倣物、ならびにＲｉｂｉのＤｅｔｏｘ、ＱｕｉｌまたはＳｕｐｅｒｆｏｓ等、他の所有権を有するアジュバントが挙げられるがこれらに限定されない。フロイントまたはＧＭ－ＣＳＦ等のアジュバントが好ましい。樹状細胞に特異的な数種の免疫学的アジュバント（例えば、ＭＦ５９）およびその調製物は、以前に記載されている（Dupuis　Mら、１９９８年；Allison　１９９８年）。また、サイトカインを使用することもできる。数種のサイトカインは、リンパ系組織への樹状細胞遊走の影響（例えば、ＴＮＦ－α）、Ｔリンパ球に対する効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟化の加速（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１およびＩＬ－４）（特にここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する、米国特許第５，８４９，５８９号）および免疫アジュバントとしての作用（例えば、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２３、ＩＬ－７、ＩＦＮ－アルファ、ＩＦＮ－ベータ）（Gabrilovichら、１９９６年）に直接的に関連付けられてきた。

【０６０４】
ＣｐＧ免疫賦活性オリゴヌクレオチドも、ワクチン設定においてアジュバントの効果を増強することが報告された。理論に制約されることなく、ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）、主にＴＬＲ９を介して自然（非適応）免疫系を活性化することにより作用する。ＣｐＧ誘発によるＴＬＲ９活性化は、ペプチドまたはタンパク質抗原、生きたまたは死滅したウイルス、樹状細胞ワクチン、自家細胞性ワクチンならびに予防的および治療的ワクチンの両方における多糖コンジュゲートを含む多種多様な抗原に対する抗原特異的体液性および細胞性応答を増強する。より重要なことに、これは、ＣＤ４Ｔ細胞の助けがなくても、樹状細胞成熟化および分化を増強し、T_{H1}細胞の活性化の増強および強力な細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）生成をもたらす。ＴＬＲ９刺激により誘導されたT_{H1}偏向は、T_{H2}偏向を正常に促進するミョウバンまたは不完全フロイントのアジュバント（ＩＦＡ）等、ワクチンアジュバントの存在下であっても維持される。ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、他のアジュバントと共にまたはマイクロ粒子、ナノ粒子、脂質エマルションもしくは類似の製剤等の製剤において製剤化または同時投与された場合、より大きいアジュバント活性を示し、これらは、抗原が相対的に弱い場合に強力な応答の誘導に特に必要である。これらはまた、免疫応答を加速し、いくつかの実験において、ＣｐＧを含まない完全用量ワクチンに対する匹敵する抗体応答により抗原用量をおよそ２桁低下させることができた（Arthur M. Krieg、Nature Reviews、Drug Discovery、５巻、２００６年６月、４７１～４８４頁）。米国特許第６，４０６，７０５（Ｂ１）号は、抗原特異的免疫応答を誘導するための、ＣｐＧオリゴヌクレオチド、非核酸アジュバントおよび抗原の使用の組合せについて記載している。市販のＣｐＧ ＴＬＲ９アンタゴニストには、Ｍｏｌｏｇｅｎ（ドイツ、ベルリン）製のｄＳＬＩＭ（ダブルステムループ免疫調節物質）があり、これは、本発明の医薬組成物の好ましい構成成分である。ＲＮＡ結合ＴＬＲ７、ＴＬＲ８および／またはＴＬＲ９等、他のＴＬＲ結合分子を使用することもできる。

【０６０５】
有用なアジュバントの他の例として、治療用におよび／またはアジュバントとして作用し得る、化学修飾されたＣｐＧ（例えば、ＣｐＲ、Ｉｄｅｒａ）、ＡｍｐｌｉＧｅｎ等のポリ（Ｉ：Ｃ）、非ＣｐＧ細菌ＤＮＡまたはＲＮＡ、ならびにシクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ（Bavacizumab）、セレブレックス（celebrex）、ＮＣＸ－４０１６、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフェニブ（sorafinib）、ＸＬ－９９９、ＣＰ－５４７６３２、パゾパニブ、ＺＤ２１７１、ＡＺＤ２１７１、抗ＣＴＬＡ４およびＳＣ５８１７５等、免疫活性小分子および抗体が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の文脈において有用なアジュバントおよび添加物の量および濃度は、当業者であれば、必要以上の実験をすることなく容易に決定することができる。

併用療法

【０６０６】
本発明はまた、患者への第２の活性剤と組み合わせた治療用量のＨＲＳポリペプチドもしくは抗体ブロッキング試薬の投与を含む併用療法または本明細書に記載されている自己免疫疾患、炎症性疾患（複数可）、筋ジストロフィー、横紋筋融解症、カヘキシーおよび他の疾患を処置するための装置もしくは手順を含む。このような文脈において、「組み合わせて投与される」は、（１）同一単位剤形の一部、（２）別々の投与、但し同一治療的処置プログラムまたはレジメンの一部、典型的には同日中の、但し必ずしもそうである必要はないことを意味する。

【０６０７】
このような併用療法のいくつかの態様において、第２の活性剤は、１種もしくは複数の抗ヒスタミン薬、１種もしくは複数の抗炎症剤、１種もしくは複数の抗新生物薬剤、１種もしくは複数の免疫抑制剤、１種もしくは複数の抗ウイルス剤、Ｂ細胞を阻害、Ｂ細胞分化もしくはメモリーＢ細胞の活性化を遮断する１種もしくは複数の薬剤または１種もしくは複数の抗酸化剤から選択される。本発明のＨＲＳポリペプチドと組み合わせた使用を見

出すことができる薬理学的薬剤または治療剤として、米国特許第４，４７４，４５１号、列４～６および米国特許第４，３２７，７２５号、列７～８に開示されている薬剤が挙げられるがこれらに限定されない。

【０６０８】

抗ヒスタミン薬の例として、ロラタジン（loradatine）、ヒドロキシジン、ジフェンヒドラミン、クロルフェニラミン、ブロムフェニラミン、シプロヘプタジン、テルフェナジン、クレマスチン、トリプロリジン、カルビノキサミン、ジフェニルピラリン、フェニンダミン、アザタジン、トリペレナミン、デクスクロルフェニラミン、デクスブロムフェニラミン、メトジラジンおよびトリメプラジン（trimprazine）、ドキシラミン、フェニラミン、ピリラミン、クロルシクリジン（chiorcyclizine）、トンジルアミンおよびこれらの誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。

【０６０９】

抗新生物剤の例として、抗生物質およびアナログ（例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシンｆ$_1$、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン（cactinomycin）、カルビシン、カルジノフィリン（carzinophilin）、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、メノガリル、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ピラルビシン、プリカマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ジノスタチン、ゾルビシン）、抗代謝剤（例えば、葉酸アナログ（例えば、デノプテリン（denopterin）、エダトレキサート、メトトレキサート、ピリトレキシム、プテロプテリン（pteropterin）、Ｔｏｍｕｄｅｘ（登録商標）、トリメトレキサート）、プリンアナログ（例えば、クラドリビン、フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン（thiamiprine）、チオグアニン）、ピリミジンアナログ（例えば、アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ドキシフルリジン、エミテフール（emitefur）、エノシタビン、フロクスウリジン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、テガフール（tagafur））が挙げられるがこれらに限定されない。

【０６１０】

抗炎症剤の例として、ステロイド系抗炎症剤および非ステロイド系抗炎症剤が挙げられるがこれらに限定されない。例示的なステロイド系抗炎症剤として、アセトキシプレグネノロン、アルクロメタゾン、アルゲストン、アムシノニド、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ブデソニド、クロロプレドニゾン、クロベタゾール、クロベタゾン、クロコルトロン、クロプレドノール、コルチコステロン、コルチゾン、コルチバゾール、デフラザコート、デソニド、デスオキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルプレドナート、エノキソロン、フルアザコート（fluazacort）、フルクロロニド（flucloronide）、フルメタゾン、フルニソリド、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオコルチンブチル、フルオコルトロン、フルオロメトロン、酢酸フルペロロン、酢酸フルプレドニデン、フルプレドニゾロン、フルランドレノリド（flurandrenolide）、プロピオン酸フルチカゾン、ホルモコータル、ハルシノニド、プロピオン酸ハロベタゾール、ハロメタゾン、酢酸ハロプレドン、ヒドロコルタメート、ヒドロコルチゾン、エタボン酸ロテプレドノール、マジプレドン（mazipredone）、メドリゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾロン、フロ酸モメタゾン、パラメタゾン、プレドニカルベート、プレドニゾロン、プレドニゾロン２５－ジエチルアミノ－アセテート、リン酸プレドニゾロンナトリウム、プレドニゾン、プレドニバール（prednival）、プレドニリデン、リメキソロン、チキソコルトール、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、トリアムシノロンベネトニド（benetonide）およびトリアムシノロンヘキサセトニドが挙げられる。

【０６１１】

例示的な非ステロイド系抗炎症剤として、アミノアリールカルボン酸誘導体（例えば、エンフェナム酸（enfenamic acid）、エトフェナメート、フルフェナム酸、イソニキシ

ン（isonixin）、メクロフェナム酸、メフェナム酸、ニフルミン酸、タルニフルメート、テロフェナメート（terofenamate）、トルフェナム酸）、アリール酢酸誘導体（例えば、アセクロフェナク、アセメタシン、アルクロフェナク、アンフェナク、アムトルメチングアシル（amtolmetin guacil）、ブロムフェナク、ブフェキサマク、シンメタシン（cinmetacin）、クロピラク、ジクロフェナクナトリウム、エトドラク、フェルビナク、フェンクロジン酸（fenclozic acid）、フェンチアザク、グルカメタシン（glucametacin）、イブフェナク、インドメタシン、イソフェゾラク（isofezolac）、イソキセパク（isoxepac）、ロナゾラク、メチアジン酸、モフェゾラク、オキサメタシン（oxametacine）、ピラゾラク（pirazolac）、プログルメタシン、スリンダク、チアラミド、トルメチン、トロペシン（tropesin）、ゾメピラック）、アリール酪酸誘導体（例えば、ブマジゾン、ブチブフェン（butibufen）、フェンブフェン、キセンブシン（xenbucin））、アリールカルボン酸（例えば、クリダナク、ケトロラク、チノリジン）、アリールプロピオン酸誘導体（例えば、アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ベルモプロフェン（bermoprofen）、ブクロキシ酸（bucloxic acid）、カプロフェン、フェノプロフェン、フルノキサプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、イブプロキサム、インドプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン、ピケトプロレン（piketoprolen）、ピルプロフェン、プラノプロフェン、プロチジン酸、スプロフェン、チアプロフェン酸、キシモプロフェン（ximoprofen）、ザルトプロフェン）、ピラゾール（例えば、ジフェナミゾール（difenamizole）、エピリゾール）、ピラゾロン（例えば、アパゾン、ベンズピペリロン（benzpiperylon）、フェプラゾン、モフェブタゾン、モラゾン（morazone）、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピペブゾン（pipebuzone）、プロピフェナゾン、ラミフェナゾン（ramifenazone）、スキシブゾン、チアゾリノブタゾン（thiazolinobutazone））、サリチル酸誘導体（例えば、アセトアミノサロール（acetaminosalol）、アスピリン、ベノリレート（benorylate）、ブロモサリゲニン（bromosaligenin）、カルシウムアセチルサリチレート、ジフルニサル、エテルサレート（ethersalate）、フェンドサール（fendosal）、ゲンチジン酸（gentisic acid）、グリコールサリチレート、イミダゾールサリチレート、リシンアセチルサリチレート、メサラミン、モルフォリンサリチレート、１－ナフチルサリチレート、オルサラジン、パルサルミド（parsalmide）、フェニルアセチルサリチレート、フェニルサリチレート、サラセタミド（salacetamide）、サリチルアミドｏ－酢酸、サリチル硫酸、サルサラート、スルファサラジン）、チアジンカルボキサミド（例えば、アンピロキシカム、ドロキシカム、イソキシカム（isoxicam）、ロルノキシカム、ピロキシカム、テノキシカム）、ε－アセトアミドカプロン酸（acetamidocaproic acid）、ｓ－アデノシルメチオニン、３－アミノ－４－ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン（amixetrine）、ベンダザック、ベンジダミン、ブコローム、ジフェンピラミド、ジタゾール、エモルファゾン、フェプラジノール（fepradinol）、グアイアズレン（guaiazulene）、ナブメトン、ニメスリド、オキサセプロール、パラニリン（paranyline）、ペリソキサール、プロカゾン、スーパーオキシドジスムターゼ、テニダップおよびジロートンが挙げられる。

【０６１２】

免疫抑制剤の例として、２－アミノ－６－アリール－５－置換ピリミジン（米国特許第４，６６５，０７７号を参照）；アザチオプリン；シクロホスファミド；ブロモクリプチン（bromocryptine）；ダナゾール；ダプソン；グルタルアルデヒド（米国特許第４，１２０，６４９号に記載されている通り、これはＭＨＣ抗原を遮蔽する）；ＭＨＣ抗原およびＭＨＣ断片の抗イディオタイプ抗体；シクロスポリンＡ；グルココルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、メチルプレドニゾロンおよびデキサメタゾン等、ステロイド；抗インターフェロン－γ、－βまたは－α抗体、抗腫瘍壊死因子－α抗体、抗腫瘍壊死因子－４３抗体、抗インターロイキン－２抗体および抗ＩＬ－２受容体抗体を含むサイトカインまたはサイトカイン受容体アンタゴニスト；抗ＣＤ１１ａおよび抗ＣＤ１８抗体を含む抗ＬＦＡ－１抗体；抗Ｌ３Ｔ４抗体；異種抗リンパ球グロブリン；汎Ｔ抗体、好ましくは、抗ＣＤ３または抗ＣＤ４／ＣＤ４ａ抗体；ＬＦＡ－３結合ドメインを含有する可溶性ペ

プチド（１９９０年７月２６日に公表された国際公開第９０／０８１８７号パンフレット）；ストレプトキナーゼ；ＴＧＦ－β；ストレプトドルナーゼ；宿主由来のＲＮＡまたはＤＮＡ；ＦＫ５０６；ＲＳ－６１４４３；デオキシスパガリン；ラパマイシン；Ｔ細胞受容体（Cohenら、米国特許第５，１１４，７２１号）；Ｔ細胞受容体断片（Offnerら、Science、２５１巻：４３０～４３２頁（１９９１年）；国際公開第９０／１１２９４号パンフレット；Ianeway、Nature、３４１巻：４８２頁（１９８９年）；および国際公開第９１／０１１３３号パンフレット）；ならびにＴ１０１３９等、Ｔ細胞受容体抗体（欧州特許第３４０，１０９号）；Hekmanら、Cancer Immunol. Immunother.３２巻：３６４～３７２頁（１９９１年）およびVlasveldら、Cancer Immunol. Immunother.４０巻：３７～４７頁（１９９５年）に記載されている抗ＣＤ１９抗体；Kieselら、Leukemia Research II、１２巻：１１１９頁（１９８７年）におけるＢ４抗体；エプラツズマブ（epratuzmab）を含む抗ＣＤ２２抗体；ベリムマブ（ベンリスタ（benalysta））を含む抗ＢＬｙＳ（ＣＤ２５７）抗体；オクレリズマブ、リツキシマブおよびオファツムマブを含む抗ＣＤ２０抗体が挙げられるがこれらに限定されない。「リツキシマブ」または「ＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標）」は、ＣＤ２０抗原に対し作製された遺伝的に操作されたキメラマウス／ヒトモノクローナル抗体を指し、米国特許第５，７３６，１３７号においては「Ｃ２Ｂ８」と命名されている。抗体は、マウス軽および重鎖可変領域配列ならびにヒト定常領域配列を含有するＩｇＧ$_1$カッパー免疫グロブリンである。リツキシマブは、およそ８．０ｎＭのＣＤ２０抗原に対する結合親和性を有する。

【０６１３】

抗ウイルス剤の例として、インターフェロンガンマ、ジドブジン、アマンタジンハイドロクロライド、リバビリン、アシクロビル、バルシクロビル（valciclovir）、ジデオキシシチジン、ホスホノギ酸、ガンシクロビルおよびこれらの誘導体が挙げられる。

Ｂ細胞を阻害し、Ｂ細胞分化またはメモリーＢ細胞の活性化を遮断する薬剤の例として、抗ＣＤ１９抗体、エプラツズマブを含む抗ＣＤ２２抗体；ベリムマブ（ベンリスタ）を含む抗ＢＬｙＳ（ＣＤ２５７）抗体；オクレリズマブ、リツキシマブ、オファツムマブを含む抗ＣＤ２０抗体および「リツキシマブ」または「ＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標）」が挙げられる。

【０６１４】

抗酸化剤の例として、アスコルベート（ascorbate）、アルファ－トコフェロール、マンニトール、還元型グルタチオン、様々なカロテノイド、システイン、尿酸、タウリン、チロシン、スーパーオキシドジスムターゼ、ルテイン、ゼアキサンチン、クリプトキサンチン（cryotpxanthin）、アスタキサンチン（astazanthin）、リコピン、Ｎ－アセチル－システイン、カルノシン、ガンマ－グルタミルシステイン、ケルセチン（quercitin）、ラクトフェリン、ジヒドロリポ酸、クエン酸塩、Ｇｉｎｋｇｏ Ｂｉｌｏｂａエキス、茶カテキン、コケモモエキス、ビタミンＥまたはビタミンＥのエステル、パルミチン酸レチニルおよびこれらの誘導体が挙げられる。他の治療剤として、スクワラミン、炭酸脱水酵素阻害剤、アルファ－２アドレナリン作動性受容体アゴニスト、抗寄生虫薬、抗真菌薬およびこれらの誘導体が挙げられる。

【０６１５】

好ましくは、ＨＲＳポリペプチドは、固定された一日投薬量で投与することができ、他の活性剤は、必要に応じて投薬される。ＨＲＳポリペプチドが、第２の活性剤と共にアジュバント療法として投与される場合、好ましい一日投薬量は、約０．１ｍｇ／ｋｇ／２４時間～約５５ｍｇ／ｋｇ／２４時間、より好ましくは、約２ｍｇ／ｋｇ／２４時間～約２０ｍｇ／ｋｇ／２４時間である。

【０６１６】

投与される各構成成分の正確な用量は、当然ながら、処方される特異的構成成分、処置されている被験体、疾患の重症度、例えば、炎症反応の重症度、投与様式および処方する医者の判断に応じて異なるであろう。よって、患者間の可変性のために、上に記す投薬量は、ガイドラインであり、医者は、医者が適切であると考慮する処置を達成するために、

化合物の用量を調整することができる。
キット
【０６１７】
本発明の実施形態は、他の態様において、本明細書に記載されている本発明の単離されたＨＲＳポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体および結合タンパク質のうち１種または複数で満たされた１個または複数の容器を含むキットを提供する。キットは、係る組成物を使用する（例えば、細胞シグナル伝達、炎症状態をモジュレートすること、診断等）仕方に関する書面の説明書を含むことができる。
【０６１８】
本明細書におけるキットは、処置されている徴候または所望の診断適用に適したまたは望まれる１種または複数種の追加的な治療剤または他の構成成分を含むこともできる。追加的な治療剤は、必要に応じて第２の容器に収容されていてよい。追加的な治療剤の例として、抗新生物剤、抗炎症剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤、血管新生剤等が挙げられるがこれらに限定されない。
【０６１９】
本明細書におけるキットは、企図された送達様式を容易にするために必要なまたは望まれる１個または複数のシリンジまたは他の構成成分（例えば、ステント、植え込み式デポー等）を含むこともできる。
【０６２０】
本発明の別の一態様において、キットは、ａ）ＨＲＳポリペプチド構成成分を含む容器と、ｂ）使用説明書とを含む。説明書は、ＨＲＳポリペプチドを取り扱う仕方、ＨＲＳポリペプチドを貯蔵する仕方およびＨＲＳポリペプチドの使用から予想すべきステップを含むことができる。
【０６２１】
本発明の別の一態様において、キットは、ａ）ＨＲＳポリペプチド構成成分をコードする核酸を含む組換えベクターまたはポリヌクレオチドを含む容器と、ｂ）使用説明書とを含む。説明書は、ベクターもしくはポリヌクレオチドを取り扱う仕方、ベクターもしくはポリヌクレオチドを貯蔵する仕方またはベクターもしくはポリヌクレオチドを細胞にトランスフェクトする仕方のステップを含むことができる。
【０６２２】
本発明の別の一態様において、ａ）薬学的に許容される製剤においてＨＲＳポリペプチド構成成分を含む医薬組成物を含む容器と、ｂ）説明書および／または添付文書とを含む、疾患または障害を処置するためのキットが提供される。
診断
【０６２３】
ＨＲＳポリペプチドおよび相当するポリヌクレオチド（ＨＲＳポリヌクレオチド）は、診断アッセイおよび診断組成物において使用することができる。とりわけ生化学的、組織学的および細胞ベースの方法および組成物が含まれている。
【０６２４】
上述および関連する実施形態は、ＨＲＳポリヌクレオチド配列（複数可）もしくは相当するＨＲＳポリペプチド配列（複数可）またはこれらの一部あるいはこれらの抗体の検出を含む。例えば、ある特定の態様は、１種または複数種の新たに同定されたＨＲＳスプライスバリアントおよび／または該スプライスバリアントの１種または複数種のスプライスジャンクションのＨＲＳポリヌクレオチド配列（複数可）もしくは相当するポリペプチド配列（複数可）またはこれらの一部の検出を含む。ある特定の実施形態において、スプライスジャンクションのうち少なくとも１種のポリヌクレオチドまたは相当するポリペプチド配列（複数可）は、該特定のＨＲＳスプライスバリアントに独特である。いくつかの実施形態において、係るＨＲＳスプライスバリアントは、例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患（複数可）、筋ジストロフィー、横紋筋融解症、カヘキシーおよび本明細書に記載されている他の疾患を含む疾患に対する感受性を示すことができる。

【０６２５】
スプライスバリアント、タンパク質分解断片その他を含むＨＲＳタンパク質断片の直接的検出も含まれている。ある特定の実施形態において、１種または複数種の新たに同定されたＨＲＳタンパク質断片の存在またはレベルは、例えば、特異的自己抗体を含む１種または複数種の細胞の種類または細胞の状況と関連または相関する。したがって、ＨＲＳポリペプチドまたはポリヌクレオチドの存在またはレベルは、異なる細胞の種類間または異なる細胞の状況間を区別するために使用することができる。ＨＲＳタンパク質断片またはその関連するポリヌクレオチドの存在またはレベルは、本明細書に記載されている当技術分野において公知のポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドベースの診断技法に従って検出することができる。

【０６２６】
ある特定の態様は、典型的には、被験体または集団被験体が特異的医学的処置に対し有利に応答するか評定するためのコンパニオン診断方法の一部としてＨＲＳタンパク質断片またはＨＲＳポリヌクレオチドを用いることができる。例えば、所定のＨＲＳポリペプチドベースの治療剤（例えば、タンパク質断片、抗体、結合剤）は、被験体（複数可）が、所定の疾患または状態に対する１種または複数種の選択されたバイオマーカーまたは抗体を有するか否かに基づき、被験体または特定の被験体集団に適していると同定され得る。バイオマーカーの例として、血清／組織マーカー、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に対する既存の抗体と共に、医学的イメージング技法によって同定され得るマーカーが挙げられる。ある特定の実施形態において、天然起源のＨＲＳタンパク質またはその断片（またはその相当するポリヌクレオチド）それ自体は、特異的被験体または特異的被験体集団における抗ＨＲＳポリペプチドレベルまたは遊離ＨＲＳポリペプチドレベルの測定に利用することができる、血清および／または組織バイオマーカーを提供することができる。ある特定の態様において、ＨＲＳポリペプチドまたはポリヌクレオチド参照配列の同定は、本明細書に記載されており、当技術分野において公知の通り、選択された被験体における、選択された組織における、あるいはそれ以外における、該配列の差次的発現の特徴付けを含むことができる。

【０６２７】
本明細書に提示されている方法のいくつかは、細胞、組織または被験体の状態または状況を特徴付けるためおよびこれを別の細胞、組織または被験体から区別するためのＨＲＳポリペプチドまたはポリヌクレオチドの差次的発現に依存する。非限定的な例として、初代細胞培養物と不死化細胞培養物等の他の細胞培養物との間に加えて、異なる種の細胞または組織、異なる組織または器官の細胞、新生児および成人等の細胞発生状況、細胞分化状況、健康、罹患および処置済等の状態、細胞内および細胞外画分の間を区別するために、生物学的試料におけるＨＲＳポリペプチドまたはポリヌクレオチドの存在またはレベルを検出する方法が挙げられる。

【０６２８】
差次的発現は、適切な対照における同一配列の発現レベルと比較した、ＨＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列の１種または複数種の遺伝子発現レベルにおける統計的有意差を含む。統計的有意差は、ＲＮＡレベル、タンパク質レベル、タンパク質機能または本明細書に記載されている測定値等の遺伝子発現の他のいずれかの関連性のある測定値により測定された発現レベルの増加または減少のいずれかに関連し得る。ＨＲＳポリヌクレオチドまたは本発明のポリペプチドと、典型的には、同一または相当する種類の全長または野生型サイトゾルまたはミトコンドリアＨＲＳ配列との間の比較も含まれている。差次的発現は、リアルタイムＰＣＲ、サブトラクティブハイブリダイゼーション、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドアレイその他等、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドベースの技法を含む、当技術分野におけるおよび本明細書に記載されている種々の技法により検出することができる。

【０６２９】
結果は、典型的には、偶然に起こった可能性が低い場合、統計的に有意と称される。検

査または結果の有意性レベルは、伝統的に、頻度論的統計仮説検査概念に関連する。単純な事例において、統計的有意性は、帰無仮説が実際に真である場合に帰無仮説を棄却すると決定する確率として定義することができる（第１種の過誤または「偽陽性決定」として公知の決定）。この決定は、多くの場合、ｐ値を使用して為される。ｐ値が有意性レベルに満たない場合、帰無仮説は棄却される。ｐ値が小さい程、結果の有意性が大きくなる。ベイズ因子は、統計的有意性の決定に利用することもできる（例えば、Goodman　S.、Ann　Intern　Med　１３０巻：１００５～１３頁、１９９９年を参照）。

【０６３０】

より複雑であるが、実際に重要な事例において、検査または結果の有意性レベルは、帰無仮説が実際に真である場合に帰無仮説を棄却すると決定する確率が、規定の確率以下である解析を反映し得る。この種類の解析は、棄却すると判定する確率が、帰無仮説内に包含される一部のセットの仮定の有意性レベルよりもさらに小さくなり得る適用を可能にする。

【０６３１】

特定の例示的な実施形態において、統計的に有意な差次的発現は、所定のＨＲＳ配列の発現レベルが、適切な対照と比較して、疑われる生体試料において少なくとも約１．２×、１．３×、１．４×、１．５×、１．６×、１．７×、１．８×、１．９×、２．０×、２．２×、２．４×、２．６×、２，８×、３．０×、４．０×、５．０×、６．０×、７．０×、８．０×、９．０×、１０．０×、１５．０×、２０．０×、５０．０×、１００．０×以上の発現差をもたらす（即ち、より高いまたはより低い発現となり得る差次的発現）（中間のあらゆる整数および小数点（例えば、１．２４×、１．２５×、２．１×、２．５×、６０．０×、７５．０×等）を含む）局面を含むことができる。ある特定の実施形態において、統計的に有意な差次的発現は、所定のＨＲＳ配列の発現レベルが、適切な対照と比較して、疑われる生体試料において少なくとも約４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００パーセント（％）以上の発現差をもたらす（即ち、より高くまたはより低くなり得る差次的発現）（中間のあらゆる整数および小数点を含む）局面を含むことができる。

【０６３２】

追加的な例として、差次的発現は、Ｚ検定を行うことにより、即ち、本明細書に記載されているおよび当技術分野において公知の絶対的Ｚスコアを計算することにより決定することもできる。Ｚ検定は、典型的には、試料平均と集団平均との間の有意差の同定に利用される。例えば、標準正規表（例えば、対照組織）と比較して、９５％信頼区間（即ち、５％有意性レベル）において、１．９６より大きい絶対値を有するＺスコアは、無作為ではないことを示す。９９％信頼区間に関して、絶対的Ｚが２．５８より大きい場合、ｐ＜．０１であり、差がさらにより有意であることを意味する－帰無仮説は、より大きい信頼で棄却され得る。上述および関連する実施形態において、１．９６、２、２．５８、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０以上（中間のあらゆる小数点を含む（例えば、１０．１、１０．６、１１．２等））の絶対的Ｚスコアは、統計的有意性の強い測定値をもたらし得る。ある特定の実施形態において、６より大きい絶対的Ｚスコアは、例外的に高い統計的有意性をもたらし得る。

【０６３３】

実質的な類似性は、一般に、生体試料と参照対照との間の発現レベルにおける統計的有意差の欠如に関する。実質的に類似の発現レベルの例は、所定のＳＳＣＩＧＳの発現レベルが、参照試料と比較して、疑われる生体試料において約．０５×、０．１×、０．２×、０．３×、０．４×、０．５×、０．６×、０．７×、０．８×、０．９×、１．０×、１．１×、１．２×、１．３×または１．４×未満の発現差をもたらす（即ち、より高いまたはより低い発現となり得る差次的発現）（中間のあらゆる小数点を含む（例えば、

．１５×、０．２５×、０．３５×等））局面を含むことができる。ある特定の実施形態において、差次的発現は、所定のＨＲＳ配列の発現レベルが、参照試料と比較して、疑われる生体試料において約０．２５、０．５、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、３０、４０、５０パーセント（％）未満の発現差をもたらす（即ち、より高くまたはより低くなり得る差次的発現）（中間のあらゆる小数点を含む）局面を含むことができる。

【０６３４】

ＨＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列の発現レベルを測定するためにＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘマイクロアレイを使用する場合等、ある特定の実施形態において、差次的発現は、典型的には、スケーリングされた（scaled）平均発現値１０００により、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘマイクロアレイスイート５ソフトウェア（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ、カリフォルニア州サンタクララ）または他の同様のソフトウェアによってまとめられた平均発現値により決定することもできる。

【０６３５】

本発明の実施形態は、細胞、組織、器官または被験体の状態を特徴付けまたは診断するために、ＨＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチド参照配列の存在またはレベルを検出する方法を含み、係る状態は、健康、罹患、罹患リスクありまたは処置済と特徴付けることができる。係る診断目的のため、用語「診断」または「診断される」は、病態の存在もしくは性質の同定、係る状態の発症リスクの特徴付けおよび／または治療法に応答した病態の変化（もしくは変化なし）の測定を含む。診断方法は、その感度および特異性が異なり得る。ある特定の実施形態において、診断アッセイの「感度」は、検査で陽性と出た罹患した細胞、組織または被験体のパーセンテージを指す（「真陽性」のパーセント）。アッセイにより検出されなかった罹患した細胞、組織または被験体は、典型的に、「偽陰性」と称される。罹患しておらず、アッセイにおいて検査で陰性と出た細胞、組織または被験体は、「真陰性」と称することができる。ある特定の実施形態において、診断アッセイの「特異性」は、１マイナス偽陽性率と定義することができ、「偽陽性」率は、疾患を持たず、検査で陽性と出た試料または被験体の割合と定義される。特定の診断方法は、状態の確定診断をもたらすことができないが、方法は、診断を助ける陽性徴候をもたらせば十分となる。

【０６３６】

場合によっては、病態の存在または発症リスクは、適した対照と比較して増加または減少したレベルのいずれであれ、状態と相関する、１種または複数種の選択されたＨＲＳポリヌクレオチドもしくはポリペプチド参照配列またはこれらの一部またはこれらの抗体の存在またはレベルを比較することにより診断することができる。「適した対照」または「適切な対照」は、組織または生物の細胞または他の生体試料、例えば、状態の非存在等、例えば、正常な形質を提示する対照または正常な細胞、組織または生物において決定される値、レベル、特色、特徴または性質を含む。ある特定の実施形態において、「適した対照」または「適切な対照」は、予め定義された値、レベル、特色、特徴または性質である。他の適した対照は、当業者に明らかとなろう。疾患および状態、例えば、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連する疾患の例は、本明細書の他の箇所に記載されている。

【０６３７】

本発明の実施形態は、検出感度によりある一定の利点をもたらす、ＨＲＳポリヌクレオチドまたは核酸ベースの検出技法を含む。したがって、ある特定の実施形態は、診断方法またはアッセイの一部としてのＨＲＳポリヌクレオチドの使用または検出に関する。ＨＲＳポリヌクレオチドの存在および／またはレベルは、とりわけ、ノーザンブロット等のハイブリダイゼーションアッセイ、定量的もしくは定性的ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、定量的もしくは定性的逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）、マイクロアレイ、ドットもしくはスロットブロットまたは蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）等のｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを含む、当技術分野において公知のいずれかの方

法により測定することができる。このような方法のいくつかは、より詳細に後述する。

【０６３８】

ＤＮＡおよびＲＮＡ等、ＨＲＳポリヌクレオチドは、Kingston.（２００２年、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons、Inc.、NY、NY（例えば、Nelsonら、Proc Natl Acad Sci U S A、９９巻：１１８９０～１１８９５頁、２００２年による記載を参照）その他に記載されている技法等、当技術分野において公知の技法を用いて、血液、生体液、組織、器官、細胞株または他の関連性のある試料から収集および／または作製することができる。さらに、ＲＮＡを構築するための種々の市販のキットは、本発明において使用されるＲＮＡの作製に有用である。ＲＮＡは、正常な健康被験体から調達される器官／組織／細胞から構築することができる。しかし、本発明は、罹患した被験体からのＲＮＡの構築も考慮する。ある特定の実施形態は、いずれかの種類の被験体または動物由来のいずれかの種類の器官の使用を考慮する。検査試料のため、ＲＮＡは、目に見える疾患があるまたはない個体（例えば、哺乳動物を含むいずれかの動物）および組織試料、生体液（例えば、全血）その他から調達することができる。

【０６３９】

ある特定の実施形態において、ｃＤＮＡ配列の増幅または構築は、検出能力の増加に役立つことができる。本開示は、当技術と共に、係る課題を実施するための必要なレベルの詳細を提供する。例示的な一実施形態において、ＲＮＡの供給源として全血が使用され、したがって、例えば、Thachら、J. Immunol. Methods. Dec ２８３巻（１～２号）：２６９～２７９頁、２００３年およびChaiら、J. Clin. Lab Anal.１９巻（５号）：１８２～１８８頁、２００５年（両者共にここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する）に記載されているＰＡＸチューブ等、ＲＮＡ安定化試薬が、必要に応じて使用される。相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）ライブラリーは、Ausubelら（２００１年、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons、Inc.、NY、NY）；Sambrookら（１９８９年、Molecular Cloning、第２版、Cold Spring Harbor Laboratory、Plainview、NY）；Maniatisら（１９８２年、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory、Plainview、NY）その他に記載されている技法等、当技術分野において公知の技法を使用して作製することができる。さらに、ｃＤＮＡライブラリーを構築するための種々の市販のキットは、本発明のｃＤＮＡライブラリーの作製に有用である。ライブラリーは、正常な健康被験体から調達された器官／組織／細胞から構築することができる。

【０６４０】

ある特定の実施形態は、ＨＲＳポリヌクレオチド配列を検出するためのハイブリダイゼーション方法を用いることができる。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイを行うための方法は、当技術分野において十分に開発されている。ハイブリダイゼーションアッセイ手順および条件は、用途に応じて変動することがあり、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第２版、Cold Spring Harbor, N.Y.、１９８９年）；Berger and Kimmel Methods in Enzymology、１５２巻、Guide to Molecular Cloning Techniques（Academic Press、Inc.、San Diego、Calif.、１９８７年）；Young and Davis、PNAS.８０巻：１１９４頁（１９８３年）において言及されている方法を含む、公知の一般的な結合方法に従って選択される。反復的および制御されたハイブリダイゼーション反応を行うための方法および器具は、これらそれぞれここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する米国特許第５，８７１，９２８号、同第５，８７４，２１９号、同第６，０４５，９９６号および同第６，３８６，７４９号、同第６，３９１，６２３号に記載されている。

【０６４１】

ある特定の実施形態は、ＨＲＳポリヌクレオチド配列を検出するための核酸増幅方法を用いることができる。用語「増幅」または「核酸増幅」は、企図される特異的標的核酸配列の少なくとも一部を含有する標的核酸の複数のコピーの産生を指す。複数のコピーは、

アンプリコンまたは増幅産物と称され得る。ある特定の実施形態において、増幅された標的は、完全標的遺伝子配列（イントロンおよびエクソン）または発現された標的遺伝子配列（エクソンおよび隣接する非翻訳配列のスプライスされた転写物）に満たないものを含有する。例えば、特異的アンプリコンは、標的ポリヌクレオチドの内部ポジションにハイブリダイズし、そこから重合を開始する増幅プライマーを使用して標的ポリヌクレオチドの一部を増幅することにより産生することができる。好ましくは、増幅された一部は、種々の周知の方法のいずれかを使用して検出され得る検出可能な標的配列を含有する。

【０６４２】

本明細書において使用される場合「選択的増幅」または「特異的増幅」は、本発明に係る標的核酸配列の増幅を指し、標的配列の検出可能な増幅は、検査されている目的の核酸試料に寄与される標的配列であって、その他の試料供給源、例えば、増幅反応において使用される試薬または増幅反応が行われる環境に存在する汚染に寄与される標的核酸配列に寄与されない標的配列の増幅に実質的に限定される。

【０６４３】

用語「増幅条件」は、本発明に係る核酸増幅を容認する条件を指す。増幅条件は、いくつかの実施形態において、本明細書に記載されている「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」よりもストリンジェント性が低くなり得る。本発明の増幅反応において使用されるオリゴヌクレオチドは、増幅条件下においてその企図される標的にハイブリダイズするが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下においてはハイブリダイズしてもしなくてもよい。他方では、本発明のプローブの検出は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において典型的にハイブリダイズする。本発明に係る核酸増幅の実施に許容される条件は、当業者であれば、用いられている特定の増幅方法に応じて容易に確認することができる。

【０６４４】

多くの周知の核酸増幅方法は、交互に二本鎖核酸を変性し、プライマーをハイブリダイズする熱サイクル（thermocycling）を要求する。しかし、他の周知の核酸増幅方法は、等温性である。通常ＰＣＲと称されるポリメラーゼ連鎖反応（米国特許第４，６８３，１９５号；同第４，６８３，２０２号；同第４，８００，１５９号；同第４，９６５，１８８号）は、複数サイクルの変性、プライマー対の反対側の鎖へのアニーリングおよびプライマー伸長を使用して、標的配列のコピー数を指数関数的に増加させる。ＲＴ－ＰＣＲと呼ばれる変法において、逆転写酵素（ＲＴ）が使用されて、ｍＲＮＡから相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）を作製し、続いてＰＣＲによりｃＤＮＡを増幅して、複数コピーのＤＮＡを産生する。

【０６４５】

上に記す通り、用語「ＰＣＲ」は、標的核酸種を選択的に増幅する複数の増幅サイクルを指す。当技術分野において詳しく記載されている、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）、リアルタイムＰＣＲ）、逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）および定量的逆転写ＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）が含まれている。用語「ｐＰＣＲ」は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応を指し、用語「ｑＲＴ－ＰＣＲ」は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応を指す。ｑＰＣＲおよびｑＲＴ－ＰＣＲは、標的とされたｃＤＮＡ分子の増幅および同時定量化に使用することができる。これは、選択されたＡＡＲＳ遺伝子または転写物等、ｃＤＮＡプールにおける特異的配列の検出および定量化の両方を可能にする。

【０６４６】

用語「リアルタイムＰＣＲ」は、ＰＣＲにおいてあらゆる二本鎖（ｄｓ）ＤＮＡに結合するＤＮＡ結合色素を使用することができ、色素の蛍光が生じる。したがって、ＰＣＲにおけるＤＮＡ産物の増加は、蛍光強度の増加をもたらし、各サイクルにおいて測定され、これによりＤＮＡ濃度の定量化を可能にする。しかし、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ等、ｄｓＤＮＡ色素は、あらゆるｄｓＤＮＡ　ＰＣＲ産物に結合するであろう。蛍光が、リアルタイムＰＣＲサーモサイクラーにおいて検出および測定され、産物の指数関数的増加に相当するその幾何的増加が、各反応における閾値サイクル（「Ｃｔ」）の決定に使用される。

【０６４７】
用語「Ｃｔスコア」は、ＰＣＲ増幅が閾値レベルを上回った時点のサイクルである、閾値サイクル数を指す。試料に存在する特定の遺伝子のｍＲＮＡの含量がより高い場合、この遺伝子は、増幅のためにより多くの出発ＲＮＡが存在するため、低く発現される遺伝子よりも早く閾値を越えるであろう。したがって、低いＣｔスコアは、試料における高い遺伝子発現を示し、高いＣｔスコアは、低い遺伝子発現を示す。
【０６４８】
ある特定の実施形態は、通常ＬＣＲと称されるリガーゼ連鎖反応（Weiss、Science.２５４巻：１２９２頁、１９９１年）を用いることができ、この方法は、標的核酸の近接領域にハイブリダイズする２セットの相補ＤＮＡオリゴヌクレオチドを使用する。ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、熱変性、ハイブリダイゼーションおよびライゲーションの反復的なサイクルにおいてＤＮＡリガーゼによって共有結合により連結されて、検出可能な二本鎖連結オリゴヌクレオチド産物を産生する。
【０６４９】
別の方法は、通常ＳＤＡと称される鎖置換増幅（Walkerら、１９９２年、PNAS USA ８９巻：３９２～３９６頁；米国特許第５，２７０，１８４号および同第５，４５５，１６６号）であり、この方法は、標的配列の反対側の鎖へのプライマー配列対のアニーリング、ｄＮＴＰαＳの存在下におけるプライマー伸長のサイクルを使用して、二本鎖ヘミホスホロチオエート化プライマー伸長産物を産生し、ヘミ修飾（hemimodify）された制限エンドヌクレアーゼ認識部位のエンドヌクレアーゼ媒介性ニッキングおよびニックの３’端からのポリメラーゼ媒介性プライマー伸長を行って、現存する鎖を置き換え、次のラウンドのプライマーアニーリング、ニッキングおよび鎖置換のための鎖を産生し、産物の幾何的増幅をもたらす。好熱性ＳＤＡ（ｔＳＤＡ）は、本質的に同一方法において、より高い温度で好熱性エンドヌクレアーゼおよびポリメラーゼを使用する（欧州特許第０６８４３１５号）。
【０６５０】
他の増幅方法は、例えば、通常ＮＡＳＢＡと称される核酸配列ベース増幅（米国特許第５，１３０，２３８号）；通常Ｑβレプリカーゼと称されるＲＮＡレプリカーゼを使用してプローブ分子それ自体を増幅する方法（Lizardiら、１９８８年、BioTechnol.６巻：１１９７～１２０２頁）；転写ベース増幅方法（Kwoh、D.ら、１９８９年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA ８６巻：１１７３～１１７７頁）；自家持続配列複製法（Guatelli、Jら、１９９０年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA ８７巻：１８７４～１８７８頁）；および通常ＴＭＡと称される転写媒介性増幅（米国特許第５，４８０，７８４号および同第５，３９９，４９１号）を含む。公知の増幅方法のさらなる考察に関して、Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications（Persingら編）、５１～８７頁（American Society for Microbiology、Washington、DC）におけるPersing、David H.、１９９３年「In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques」を参照されたい。
【０６５１】
実例としての本発明の転写ベース増幅系は、ＲＮＡポリメラーゼを用いて標的領域の複数のＲＮＡ転写物を産生するＴＭＡを含む（米国特許第５，４８０，７８４号および同第５，３９９，４９１号）。ＴＭＡは、逆転写酵素およびＲＮＡポリメラーゼの存在下において標的核酸にハイブリダイズして、ＲＮＡポリメラーゼがＲＮＡ転写物を産生する二本鎖プロモーターを形成する「プロモータープライマー」を使用する。このような転写物は、ＲＮＡ転写物にハイブリダイズすることのできる第２のプライマーの存在下におけるさらなるラウンドのＴＭＡのための鋳型となることができる。熱変性を要求するＰＣＲ、ＬＣＲまたは他の方法とは異なり、ＴＭＡは、ＲＮａｓｅ Ｈ活性を使用して、ＲＮＡ：ＤＮＡハイブリッドのＲＮＡ鎖を消化し、これによりＤＮＡ鎖をプライマーまたはプロモータープライマーとのハイブリダイゼーションに利用できるようにする等温性の方法である。一般に、増幅に提供された逆転写酵素に関連するＲＮａｓｅ Ｈ活性が使用される。

【０６５２】
実例としてのＴＭＡ方法において、一方の増幅プライマーは、オリゴヌクレオチドプロモータープライマーであり、これは、標的結合配列の５’に位置する二本鎖となると機能的となるプロモーター配列を含み、増幅される配列の３’の位置における標的ＲＮＡの結合部位にハイブリダイズすることができる。プロモータープライマーは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ認識に特異的である場合、「Ｔ７プライマー」と称され得る。ある特定の境遇において、プロモータープライマーまたは係るプロモータープライマーの亜集団の３’端は、プライマー伸長を遮断または低下するよう修飾することができる。逆転写酵素は、非修飾プロモータープライマーから標的ＲＮＡのｃＤＮＡコピーを生成するが、ＲＮａｓｅ　Ｈ活性が、標的ＲＮＡを分解する。次に、第２の増幅プライマーが、ｃＤＮＡに結合する。このプライマーは、「Ｔ７プライマー」から区別するために「非Ｔ７プライマー」と称され得る。逆転写酵素は、この第２の増幅プライマーから別のＤＮＡ鎖を生成し、一端に機能的プロモーターを有する二本鎖ＤＮＡを生じる。二本鎖になると、プロモーター配列がＲＮＡポリメラーゼと結合して、プロモータープライマーがハイブリダイズした標的配列の転写を開始することができる。ＲＮＡポリメラーゼは、複数のＲＮＡ転写物（即ち、アンプリコン）、一般に約１００～１，０００コピーを産生するためにこのプロモーター配列を使用する。新たに合成されたアンプリコンのそれぞれは、第２の増幅プライマーとアニーリングすることができる。続いて、逆転写酵素は、ＤＮＡコピーを生成することができるが、ＲＮａｓｅ　Ｈ活性が、このＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖のＲＮＡを分解する。続いて、プロモータープライマーは、新たに合成されたＤＮＡに結合し、逆転写酵素に二本鎖ＤＮＡを生成させ、これからＲＮＡポリメラーゼが、複数のアンプリコンを生成することができる。よって、２種の増幅プライマーを用いて、十億倍の等温増幅を達成することができる。

【０６５３】
ある特定の実施形態において、マイクロアレイ解析（Hanら、Nat Biotechnol、１９巻：６３１～６３５頁、２００１年；Baoら、Anal Chem、７４巻：１７９２～１７９７頁、２００２年；Schenaら、PNAS. USA ９３巻：１０６１４～１９頁、１９９６年；およびHellerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９４巻：２１５０～５５頁、１９９７年）およびＳＡＧＥ（遺伝子発現の連続的解析）を含む他の技法を使用して、特定のｃＤＮＡライブラリー由来の転写物のＲＮＡ転写物を評価することができる。ＭＰＳＳと同様に、ＳＡＧＥは、デジタルであり、ＭＰＳＳ等の技法から得られるものよりも数桁少ないが、多数の署名配列を作製することができる（例えば、Velculescu、V. E.ら、Trends Genet、１６巻：４２３～４２５頁、２０００年；Tuteja R. and Tuteja N. Bioessays.２００４年8月；２６巻（８号）：９１６～２２頁を参照）。

【０６５４】
ある特定の実施形態において、用語「マイクロアレイ」は、基板に結合した多数の核酸を有する「核酸マイクロアレイ」を含み、多数の結合した核酸それぞれへのハイブリダイゼーションを別々に検出することができる。基板は、固体または多孔性、平面的または非平面的、単一または分布していてよい。核酸マイクロアレイは、いわゆる、Schena（編）、DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series)、Oxford University Press（１９９９年）；Nature Genet.２１巻（１号）（増補）：１～６０頁（１９９９年）；Schena（編）、Microarray Biochip: Tools and Technology、Eaton Publishing Company/BioTechiques Books Division（２０００年）におけるあらゆる装置を含む。核酸マイクロアレイは、基板に結合した多数の核酸を含むことができ、多数の核酸は、例えば、Brennerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA ９７巻（４号）：１６６５～１６７０頁（２０００年）に記載されている通り、単一平面基板上よりもむしろ、多数のビーズ上に配置されている。核酸マイクロアレイの例は、その開示をここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、米国特許第６，３９１，６２３号、同第６，３８３，７５４号、同第６，３８３，７４９号、同第６，３８０，３７７号、同第６，３７９，８９７号、同第６，３７６，１９１号、同第６，３７２，４３

１号、同第６，３５１，７１２号　同第６，３４４，３１６号、同第６，３１６，１９３号、同第６，３１２，９０６号、同第６，３０９，８２８号、同第６，３０９，８２４号、同第６，３０６，６４３号、同第６，３００，０６３号、同第６，２８７，８５０号、同第６，２８４，４９７号、同第６，２８４，４６５号、同第６，２８０，９５４号、同第６，２６２，２１６号、同第６，２５１，６０１号、同第６，２４５，５１８号、同第６，２６３，２８７号、同第６，２５１，６０１号、同第６，２３８，８６６号、同第６，２２８，５７５号、同第６，２１４，５８７号、同第６，２０３，９８９号、同第６，１７１，７９７号、同第６，１０３，４７４号、同第６，０８３，７２６号、同第６，０５４，２７４号、同第６，０４０，１３８号、同第６，０８３，７２６号、同第６，００４，７５５号、同第６，００１，３０９号、同第５，９５８，３４２号、同第５，９５２，１８０号、同第５，９３６，７３１号、同第５，８４３，６５５号、同第５，８１４，４５４号、同第５，８３７，１９６号、同第５，４３６，３２７号、同第５，４１２，０８７号および同第５，４０５，７８３号に見出すことができる。

【０６５５】

追加的な例として、ＧＥＮＥＣＨＩＰ（商標）の商標名でＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（カリフォルニア州サンタクララ）から市販されている核酸アレイが挙げられる。さらに別の例示的なアレイの製造および使用方法は、例えば、米国特許第７，０２８，６２９号；同第７，０１１，９４９号；同第７，０１１，９４５号；同第６，９３６，４１９号；同第６，９２７，０３２号；同第６，９２４，１０３号；同第６，９２１，６４２号；および同第６，８１８，３９４号に提示されている。

【０６５６】

アレイおよびマイクロアレイに関連する本発明は、固体基板に付着したポリマーの多くの使用も考慮する。このような使用は、遺伝子発現モニタリング、プロファイリング、ライブラリースクリーニング、遺伝子型決定および診断を含む。遺伝子発現モニタリングおよびプロファイリング方法ならびに遺伝子発現モニタリングおよびプロファイリングに有用な方法は、米国特許第５，８００，９９２号、同第６，０１３，４４９号、同第６，０２０，１３５号、同第６，０３３，８６０号、同第６，０４０，１３８号、同第６，１７７，２４８号および同第６，３０９，８２２号に示されている。遺伝子型決定およびその使用は、米国特許出願第１０／４４２，０２１号、同第１０／０１３，５９８号（米国特許出願公開第２００３／００３６０６９号）ならびに米国特許第５，９２５，５２５号、同第６，２６８，１４１号、同第５，８５６，０９２号、同第６，２６７，１５２号、同第６，３００，０６３号、同第６，５２５，１８５号、同第６，６３２，６１１号、同第５，８５８，６５９号、同第６，２８４，４６０号、同第６，３６１，９４７号、同第６，３６８，７９９号、同第６，６７３，５７９号および同第６，３３３，１７９号に示されている。本明細書に開示されている方法と組み合わせて使用することができる核酸増幅、標識および解析の他の方法は、米国特許第５，８７１，９２８号、同第５，９０２，７２３号、同第６，０４５，９９６号、同第５，５４１，０６１号および同第６，１９７，５０６号に具体化されている。

【０６５７】

当業者には明らかであろうが、ある特定の実施形態は、本明細書に記載されている通り、増幅または検出のためのプライマーまたはプローブ等、オリゴヌクレオチドを用いることができる。定義された配列および化学構造のオリゴヌクレオチドは、化学または生化学的合成および組換え核酸分子、例えば、細菌またはウイルスベクターからのｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ発現等、当業者に公知の技法によって産生することができる。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、野生型染色体ＤＮＡまたはそのｉｎ　ｖｉｖｏ転写産物のみからなる訳ではない。

【０６５８】

所定の修飾が所定のオリゴヌクレオチドの所望の機能と適合性である限り、オリゴヌクレオチドまたはプライマーは、いかなる仕方で修飾されてもよい。当業者は、所定の修飾が、本発明のいずれか所定のオリゴヌクレオチドに適しているまたは望ましいか容易に決

定することができる。関連性のあるＡＡＲＳオリゴヌクレオチドは、本明細書の他の箇所においてより詳細に記載されている。

【０６５９】

オリゴヌクレオチドの設計および配列は、本明細書に記載されているその機能に依存するが、いくつかの可変性が一般に考慮される。最も関連性のあるものの中でも、とりわけ長さ、融解温度（Ｔｍ）、特異性、システムにおける他のオリゴヌクレオチドとの相補性、Ｇ／Ｃ含量、ポリピリミジン（Ｔ、Ｃ）またはポリプリン（Ａ、Ｇ）ストレッチおよび３’端配列が挙げられる。上述および他の可変性の制御は、オリゴヌクレオチド設計の標準かつ周知の態様であり、様々なコンピュータプログラムを、最適のオリゴヌクレオチドに対する多数の潜在的オリゴヌクレオチドのスクリーニングに容易に利用することができる。

【０６６０】

したがって、ある特定の実施形態は、試料における、本明細書に記載されている参照ＡＡＲＳポリヌクレオチドの配列を含む標的ＡＡＲＳポリヌクレオチドを検出するための方法であって、ａ）試料における標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を含むプローブであって、前記標的ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするプローブと試料を、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下でハイブリダイズさせるステップと、ｂ）前記ハイブリダイゼーション複合体の存在または非存在と、存在するのであれば必要に応じてその量を検出するステップとを含む方法を含む。試料における、本明細書に記載されている参照ＨＲＳポリヌクレオチドの配列を含む標的ＨＲＳポリヌクレオチドを検出するための方法であって、ａ）標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅するステップと、ｂ）前記増幅された標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在または非存在と、存在するのであれば必要に応じてその量を検出するステップとを含む方法も含まれている。特定の実施形態は、ハイブリダイゼーションであれ、増幅または他の検出方法によるものであれ、スプライスバリアントの独特なスプライスジャンクションの検出による等、ＡＡＲＳスプライスバリアントの検出に関する。

【０６６１】

本発明の実施形態は、抗体ベースの検出技法を含む、種々のＨＲＳポリペプチドベースの検出技法を含む。上述の実施形態において、血清、全血または血漿等、生体試料における抗ＨＲＳ抗体を検出、定量化またはエピトープマップするためのＨＲＳポリペプチドの使用が含まれている。ある特定の実施形態は、イメージング装置を利用する、ウエスタンブロッティングおよび免疫沈降、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光アッセイ（ＩＦＡ）等、標準方法論および検出器を用いることができる。

【０６６２】

係るヒトＨＲＳポリペプチドは、驚くべきことに、非ヒトおよび／または粗調製物のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に頼る既存の抗体検出方法論と比較して優れた抗体結合特徴を保有する。

【０６６３】

これらアッセイのいくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、表Ｄ１～Ｄ９に収載されているまたはこれに由来し得るＨＲＳポリペプチドである。いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、固体表面への付着を容易にするためのタグを含む。一実施形態において、タグは、ポリｈｉｓタグである。

【０６６４】

したがって、いくつかの実施形態において、ＨＲＳポリペプチドは、患者のプロファイルに使用して、そのＪｏ－１抗体疾患負担を同定することができる。係るプロファイルは、ＨＲＳポリペプチド処置から恩恵を受けるであろう亜集団へと患者を選択し、可能性の高い治療成績を予見し、および／または治療剤としての使用に最も適したＨＲＳポリペプチド（複数可）を同定することを可能にする。

【０６６５】
一実施形態において、本発明は、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を有するリスクのあるヒト被験体を同定するための方法であって、ａ）被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、ｂ）被験体が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素またはＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあると被験体を同定するステップとを含む方法を含む。
【０６６６】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において約１マイクロモル濃度より高いヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあると同定することができる。
【０６６７】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において、約２マイクロモル濃度より高いヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあると同定することができる。
【０６６８】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において、約４マイクロモル濃度より高いヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせる高リスクがあると同定することができる。
【０６６９】
別の一実施形態において、本発明は、自己免疫状態または炎症状態を有するヒト被験体を処置するためのＨＲＳポリペプチドを選択するための方法であって、ａ）被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、ｂ）野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素と比較して、抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体に対する親和性が低減しているＨＲＳポリペプチドを選択するステップとを含む方法を含む。
【０６７０】
一実施形態において、本発明は、ヒト被験体の疾患進行を予後判定するための方法であって、ａ）被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、ｂ）被験体が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素またはＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、より重篤な疾患を生じさせるリスクがあるとして被験体を同定するステップとを含む方法を含む。
【０６７１】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において、約１マイクロモル濃度より高いヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、より重篤な疾患を生じさせるリスクがあると同定することができる。
【０６７２】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において、約２マイクロモル濃度より高いヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、より重篤な疾患を生じさせるリスクがあると同定することができる。
【０６７３】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において、約４マイクロモル濃度より高いヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、より重篤な疾患を生じさせる高リスクがあると同定することができる。
【０６７４】
別の一実施形態において、本発明は、ＨＲＳポリペプチド投与に対する被験体の応答を予測するための方法であって、ａ）被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、ｂ）被験体が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素またはＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有さない場合、ＨＲＳポリペプチド投与に適していると被験体を同定するステップとを含む方法を含む。

【０６７５】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において、約１マイクロモル濃度未満のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、ＨＲＳポリペプチド投与に適していると同定することができる。
【０６７６】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において、約０．１マイクロモル濃度未満のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、ＨＲＳポリペプチド投与に適していると同定することができる。
【０６７７】
いくつかの態様において、被験体が、その血清において、約０．０１マイクロモル濃度より高いヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度を有する場合、被験体は、ＨＲＳポリペプチド投与に適していると同定することができる。
【０６７８】
ある特定の実施形態は、「マイクロアレイ」等、「アレイ」を用いることができる。ある特定の実施形態において、「マイクロアレイ」は、基板に結合したコレクションまたは多数のポリペプチドを有する「ペプチドマイクロアレイ」または「タンパク質マイクロアレイ」を指すこともでき、多数の結合したポリペプチドそれぞれへの結合は、別々に検出可能である。あるいは、ペプチドマイクロアレイは、多数のバインダーを有することができ、バインダーの例として、本明細書に記載されているＨＲＳポリペプチドの結合を特異的に検出することができるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ファージディスプレイバインダー、酵母２ハイブリッドバインダーおよびアプタマーが挙げられるがこれらに限定されない。アレイは、例えば、Robinsonら、Nature Medicine ８巻（３号）：２９５～３０１頁（２００２年）に記載されている通り、これらのＨＲＳポリペプチドの自己抗体検出に基づくことができる。ペプチドアレイの例は、これらそれぞれここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、国際公開第０２／３１４６３号パンフレット、国際公開第０２／２５２８８号パンフレット、国際公開第０１／９４９４６号パンフレット、国際公開第０１／８８１６２号パンフレット、国際公開第０１／６８６７１号パンフレット、国際公開第０１／５７２５９号パンフレット、国際公開第００／６１８０６号パンフレット、国際公開第００／５４０４６号パンフレット、国際公開第００／４７７７４号パンフレット、国際公開第９９／４０４３４号パンフレット、国際公開第９９／３９２１０号パンフレットおよび国際公開第９７／４２５０７号パンフレットならびに米国特許第６，２６８，２１０号、同第５，７６６，９６０号および同第５，１４３，８５４号に見出すことができる。
【０６７９】
ある特定の実施形態は、ＨＲＳポリペプチド配列を診断用に検出するためのＭＳまたは他の分子量に基づく方法を用いることができる。質量分析（ＭＳ）は、一般に、試料または分子の元素組成を決定するための分析技法を指す。ＭＳは、ペプチドおよび他の化合物等、分子の化学構造の決定に使用することもできる。
【０６８０】
一般に、ＭＳ原理は、化合物をイオン化して荷電分子または分子断片を生成し、続いてその質量対電荷比を測定するステップからなる。実例としてのＭＳ手順において、試料をＭＳ機器にローディングし、気化を行い、種々の方法（例えば、電子ビームでインパクトを与える）のうち一法により試料の構成成分をイオン化し、これにより、正電荷を持つ粒子の生成をもたらし、続いて磁場により陽イオンを加速し、電磁場を移行する際のイオンの運動の詳細に基づき粒子の質量対電荷比（ｍ／ｚ）において算出を行い、先のステップにおいてｍ／ｚに従って選別されたイオンを検出した。
【０６８１】
実例としてのＭＳ機器は、３個のモジュールを有する。気相試料分子をイオンに変換するイオン源（あるいは、エレクトロスプレーイオン化の場合は、溶液に存在するイオンを気相に移動させる）；電磁場を印加することによりその質量によりイオンを選別する質量

分析器；および指標含量の値を測定し、存在する各イオンの存在量を計算するためのデータを提供する検出器。

【０６８２】

ＭＳ技法は、未知の化合物の同定、分子における元素の同位体組成の決定およびその断片化の観察による化合物の構造の決定を含む、定性的および定量的使用の両方を有する。他の使用は、試料における化合物の量の定量化または気相イオン化学の基礎の試験（真空におけるイオンおよび中性（neutral）の化学）を含む。ガスクロマトグラフィー質量分析（ＧＣ／ＭＳまたはＧＣ－ＭＳ）、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ／ＭＳまたはＬＣ－ＭＳ）およびイオン移動度分光分析／質量分析（ＩＭＳ／ＭＳまたはＩＭＭＳ）が含まれている。したがって、ＭＳ技法は、本明細書に提示されている方法のいずれかに従って使用して、生体試料における本発明のＡＡＲＳポリペプチドの存在またはレベルを測定し、このようなレベルを対照試料または所定の値と比較することができる。

【０６８３】

ある特定の実施形態は、ＡＡＲＳポリヌクレオチドまたはポリペプチドの存在またはレベルを検出または定量化するために、細胞選別または細胞可視化またはイメージング装置／技法を用いることができる。例として、フローサイトメトリーまたはＦＡＣＳ、免疫蛍光解析（ＩＦＡ）および蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）等のｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション技法が挙げられる。

【０６８４】

ある特定の実施形態は、診断目的のために、従来の生物学的方法、ソフトウェアおよびシステムを用いることができる。本発明のコンピュータソフトウェア製品は、典型的に、本発明の方法の論理ステップを実行するためのコンピュータ実行可能命令を有するコンピュータ可読媒体を含む。適したコンピュータ可読媒体は、フロッピー（登録商標）ディスク、ＣＤ－ＲＯＭ／ＤＶＤ／ＤＶＤ－ＲＯＭ、ハードディスク・ドライブ、フラッシュメモリ、ＲＯＭ／ＲＡＭ、磁気テープ等を含む。コンピュータ実行可能命令は、適したコンピュータ言語または数種の言語の組合せに書き込むことができる。基礎的計算機生物学方法は、例えば、Setubal and Meidanisら、Introduction to Computational Biology Methods（PWS Publishing Company、Boston、１９９７年）；Salzberg, Searles, Kasif（編）、Computational Methods in Molecular Biology（Elsevier, Amsterdam、１９９８年）；Rashidi and Buehler, Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine（CRC Press、London、２０００年）およびOuelette and Bzevanis Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins（Wiley & Sons, Inc.、第２版、２００１年）に記載されている。米国特許第６，４２０，１０８号を参照されたい。

【０６８５】

ある特定の実施形態は、プローブ設計、データ管理、解析および機器操作等、種々の目的のために、様々なコンピュータプログラム製品およびソフトウェアを用いることができる。米国特許第５，５９３，８３９号、同第５，７９５，７１６号、同第５，７３３，７２９号、同第５，９７４，１６４号、同第６，０６６，４５４号、同第６，０９０，５５５号、同第６，１８５，５６１号、同第６，１８８，７８３号、同第６，２２３，１２７号、同第６，２２９，９１１号および同第６，３０８，１７０号を参照されたい。

【０６８６】

全ゲノムサンプリングアッセイ（ＷＧＳＡ）は、例えば、Kennedyら、Nat. Biotech. ２１巻、１２３３～１２３７頁（２００３年）、Matsuzakiら、Gen. Res.１４巻：４１４～４２５頁（２００４年）およびMatsuzakiら、Nature Methods １巻：１０９～１１１頁（２００４年）に記載されている。マッピングアッセイによる使用のためのアルゴリズムは、例えば、Liuら、Bioinformatics.１９巻：２３９７～２４０３頁（２００３年）およびDiら、Bioinformatics.２１巻：１９５８頁（２００５年）に記載されている。ＷＧＳＡに関連する追加的な方法およびＷＧＳＡに有用なアレイおよびＷＧＳＡの応用は、例えば、２００５年４月２９日に出願された米国特許出願第６０／６７６，０５８号、2

００４年１０月５日に出願された同第６０／６１６，２７３号、同第１０／９１２，４４５号、同第１１／０４４，８３１号、同第１０／４４２，０２１号、同第１０／６５０，３３２号および同第１０／４６３，９９１号に開示されている。マッピングアッセイを用いたゲノムワイド関連試験は、例えば、Huら、Cancer Res.；６５巻（７号）：２５４２～６頁（２００５年）、Mitraら、Cancer Res.、６４巻（２１号）：８１１６～２５頁（２００４年）、Butcherら、Hum Mol Genet.、１４巻（１０号）：１３１５～２５頁（２００５年）およびKleinら、Science.３０８巻（５７２０号）：３８５～９頁（２００５年）に記載されている。

【０６８７】

その上、ある特定の実施形態は、例えば、米国特許出願第１０／１９７，６２１号、同第１０／０６３，５５９号（米国特許出願公開第２００２／０１８３９３６号）、同第１０／０６５，８５６号、同第１０／０６５，８６８号、同第１０／３２８，８１８号、同第１０／３２８，８７２号、同第１０／４２３，４０３号および同第６０／４８２，３８９号に示す通り、インターネット等、ネットワーク上で遺伝情報を提供するための方法を含むことができる。

【実施例】

【０６８８】

（実施例１）

ＨＩＳタグ付きリゾカイン（ＨＲＳ（１～６０））の産生

コドン最適化および遺伝子合成

リゾカイン（ＨＲＳ（１～６０））をコードするＤＮＡを、ＤＮＡ２．０（カリフォルニア州メンローパーク）により開発されたアルゴリズムを用いてＥ．ｃｏｌｉ発現にコドン最適化した。Ｃ末端６×Ｈｉｓタグを有する遺伝子を合成して、Ｔ７プロモーターを転写駆動に使用し、カナマイシン抵抗性を抗生物質選択のために使用するｐＪｅｘｐｒｅｓｓ４１１ベクターにサブクローニングした。コドン最適化されたＤＮＡ配列を次に示す。

【化２】

ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGAACGTGTTCGTGG
TCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGAAGAGGTGGCCAAACTGCTG
AAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCGGACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCC
GAAACACCACCATCACCATCAC (**配列番号** 40)

【０６８９】

翻訳されたタンパク質配列を次に示す。

【化３】

MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKH
HHHHH (**配列番号** 41)

【０６９０】

発現株。ＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテント細胞（Ｎｏｖａｇｅｎ、ｃａｔ．ｎｏ．６９４５０）を、コドン最適化された発現構築物で形質転換した。簡潔に説明すると、プラスミド（１μＬ）を５０μＬのコンピテント細胞に加えた。反応液を混合し、氷上で３０分間インキュベートした。反応液に４２℃で３０秒間熱ショックを与え、続いて氷上で２分間低温ショックを与えた。次に、ＳＯＣ培地（５００μＬ）を加え、チューブを３７℃、２５０ｒｐｍにて１時間インキュベートした。最後に、培養物のアリコート（５０μＬ）をカナマイシンプレート（Ｔｅｋｎｏｖａ Ｓ９６４１）上に広げ、３７℃で一晩インキュベートした。単一コロニーをつつき、発現スケールアップに使用した。

【０６９１】

培地。２００ｍＬの無菌Ｍ９最小塩５×（ＢＤ２４８５１０）、７７８ｍＬの無菌精製水における３０ｇ／Ｌ酵母エキス（ＢＤ２１２７５０）、２０ｍＬの滅菌２０％グルコー

ス（Ｓｉｇｍａ　Ｇ７０２１）および２ｍＬの無菌１．０Ｍ　ＭｇＳＯ４（Ｓｉｇｍａ　Ｍ７５０６）を混合することにより、Ｍ９ＹＥ培地を調製した。フィーディング（feeding）溶液は、５％酵母エキス、５０％グルコース、微量元素および２ｇ／Ｌ硫酸マグネシウムを含有する。硫酸カナマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１５１６０）を、最終濃度１００μｇ／ｍＬとなるようＭ９ＹＥおよびフィーディング溶液の両方に加えた。

【０６９２】

フェドバッチ発酵。ＭＦＣＳ／ＤＡソフトウェアを備える４Ｌ発酵槽（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｂｉｏｓｔａｔ　Ｂプラス）を、フェドバッチ発酵に使用した。撹拌は、１０００ｒｐｍに設定した。３０％水酸化アンモニウム（Ｓｉｇｍａ　２２１２２８）および３０％リン酸（Ｓｉｇｍａ　Ｐ５８１１）の添加により、ｐＨ値を７．０に自動的に制御した。オイルフリーのダイヤフラム空気圧縮機（Ｃｏｌｅ－Ｐａｒｍｅｒ）により、流速４Ｌ／分で空気を提供した。空気は、０．２μｍ　Ｍｉｄｉｓａｒｔ２０００フィルター（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　１７８０５）に通した。純粋酸素（Ｗｅｓｔ　Ａｉｒ）を自動的に供給して、溶存酸素レベルを７０％に制御した。Ｎｅｓｌａｂ　ＲＴＥ７循環機（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）により、温度を３０℃に制御した。消泡剤２０４（Ｓｉｇｍａ　Ａ８３１１）の添加により、泡立ちを制御した。発酵槽におけるＭ９ＹＥ培地の初期容量は、３Ｌであった。３０℃、２５０ｒｐｍで一晩育成した１５０ｍＬのシード培養物を発酵槽に接種した。器内のグルコースが枯渇したら、０．９ｍＬ／分に設定した蠕動ポンプにより、濃縮フィーディング溶液を器内に導入した。６００ｎｍにおける細胞の光学密度が約３０に達したら、０．５ｍＭ　ＩＰＴＧ（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＢＰ１７５５）により培養物を誘導した。培養物を一晩培養し（約１８時間フェドバッチ相）、６，０００×ｇにおける１時間の遠心分離により収集した。精製するまで細胞ペレットを－２０℃で貯蔵した。リゾカインの発現をＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいて確認した。

【０６９３】

リゾカインの精製。凍結した細胞ペースト（７０ｇ）を、２８０ｍＬ（即ち、４ｍＬ／ｇ細胞ペースト）の溶菌（lysis）緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　β－ＭＥ、ｐＨ７．５）に再懸濁した。完全ＥＤＴＡフリーのプロテアーゼ阻害剤の錠剤（Ｒｏｃｈｅ）を、１錠剤／５０ｍＬの比でこの懸濁液に加えた。この懸濁液を、氷で冷却しつつ微小流体化装置（microfluidizer）（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）に１５，０００ｐｓｉで2回通した。ライセートを１５，０００×ｇで３０分間、４℃で遠心分離した。０．４５＋０．２２μｍ　Ａｃｒｏｐａｋ４００カプセルフィルター（Ｐａｌｌ）により上清を濾過した。

【０６９４】

清澄化したライセートを、Ｎｉ－ＮＴＡ結合緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭイミダゾール、ｐＨ７．５）で前平衡化したＮｉ－ＮＴＡ樹脂（Ｑｉａｇｅｎ）に結合させた。カラムを５０カラム容量のＮｉ－ＮＴＡ結合緩衝液＋０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１１４で洗浄し、続いて２０カラム容量のＮｉ－ＮＴＡ結合緩衝液で洗浄した。結合したタンパク質、リゾカインを４カラム容量のＮｉ－ＮＴＡ溶出緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、３００ｍＭイミダゾール、ｐＨ７．５）で溶出させた。

【０６９５】

陽イオン交換カラムにより、Ｎｉ－ＮＴＡ溶出液をさらに精製した。具体的には、Ｎｉ－ＮＴＡ溶出液をＳＰ結合緩衝液（１０ｍＭリン酸Ｎａ、ｐＨ７．０）で２０倍希釈し、ＳＰ結合緩衝液で前平衡化した３３ｍＬ　ＳＰ－セファロースＨＰカラムにローディングした。カラム寸法は、直径２．６ｃｍ、高さ６．２ｃｍであった。１０カラム容量に及ぶＳＰ結合緩衝液における０～０．５Ｍ　ＮａＣｌの直線勾配により、所望の生成物をカラムから溶出させた。精製タンパク質を６ｍｇ／ｍＬとなるよう濃縮し、緩衝液をＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ｐｒｏｄｕｃｔ＃１００１０）に交換し、０．２２μｍ無菌フィルターにより濾過した。精製タンパク質の収率は、１５０ｍｇ（７０ｇの細胞ペーストか

ら）であり、そのエンドトキシンレベルは、＜１．７ＥＵ／ｍｇであった。

【０６９６】

（実施例２）

ＨＩＳタグ付き全長ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）の産生

【０６９７】

コドン最適化および遺伝子合成。全長ＨｉｓＲＳ遺伝子をＥ．ｃｏｌｉ発現にコドン最適化し、Ｔ７プロモーターを転写駆動に使用するｐＥＴ２１ａベクターにサブクローニングした。加えて、５アミノ酸リンカーおよび６×Ｈｉｓタグを Ｃ末端に付着した。

【０６９８】

ＤＮＡ配列を次に示す。

【化４】

ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAACGCGTACGTGG
TCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGAAGAAGTTGCCAAATTACTGA
AACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCC
AAAGGAACCCGTGATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTT
ATTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGTATTTGAATTG
AAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTATGATTTGAAAGA
CCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTT
AGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGA
CAACCCTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGC
CGGAAATTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAAAATTATGTGTGAAATTCT
GAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTAAAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGG
TATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGAC
AAATTGGATAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCC
TGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCT
TAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGA
CTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATT
AGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT
GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGC
AGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACC
ATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTCGAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAA
GCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAA
AAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGGCATCAAGGC
CGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAG
CTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAAAGATGGCGTGATTAAAC
TGCGTTCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAA
ATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTATGTATTTGCGCGGCCGCACTCGAGCACCACCAC
CACCACCAC**TGA**（**配列番号** 42）

【０６９９】

翻訳されたタンパク質の配列を次に示す。

【化５】

MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKG
TRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAEVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGE
LLSLRYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDP
MIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEE
VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY
LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMF
DPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSELWD
AGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVE
EIKRRTGQPLCICAAALEHHHHHH (**配列番号** 43)

【０７００】

発現株。ＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテント細胞（Ｎｏｖａｇｅｎ、ｃａｔ．ｎｏ．６９４５０）を、コドン最適化された発現構築物で形質転換した。簡潔に説明すると、プラスミド（１μＬ）を５０μＬのコンピテント細胞に加えた。反応液を混合し、氷上で３０分間インキュベートした。反応液に４２℃で３０秒間熱ショックを与え、続いて氷上で２分間低温ショックを与えた。次に、ＳＯＣ培地（５００μＬ）を加え、チューブを３７℃、２５０ｒｐｍで１時間インキュベートした。最後に、培養物のアリコート（５０μＬ）をアンピシリンプレート（Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｓ９６４１）上に広げ、３７℃で一晩インキュベートした。単一コロニーをつつき、発現スケールアップに使用した。

【０７０１】

培地。２００ｍＬの無菌Ｍ９最小塩５×（ＢＤ２４８５１０）、７７８ｍＬの無菌精製水における３０ｇ／Ｌ酵母エキス（ＢＤ２１２７５０）、２０ｍＬの滅菌２０％グルコース（Ｓｉｇｍａ　Ｇ７０２１）および２ｍＬの無菌１．０Ｍ　ＭｇＳＯ４（Ｓｉｇｍａ　Ｍ７５０６）を混合することにより、Ｍ９ＹＥ培地を調製した。フィーディング溶液は、５％酵母エキス、５０％グルコース、微量元素および２ｇ／Ｌ硫酸マグネシウムを含有する。Ｍ９ＹＥおよびフィーディング溶液の両方に、最終濃度１００μｇ／ｍＬとなるようアンピシリンを加えた。

【０７０２】

フェドバッチ発酵。ＭＦＣＳ／ＤＡソフトウェアを備える４Ｌ発酵槽（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｂｉｏｓｔａｔ　Ｂプラス）をフェドバッチ発酵に使用した。撹拌は、１０００ｒｐｍに設定した。３０％水酸化アンモニウム（Ｓｉｇｍａ　２２１２２８）および３０％リン酸（Ｓｉｇｍａ　Ｐ５８１１）の添加により、ｐＨ値を７．０に自動的に制御した。オイルフリーのダイヤフラム空気圧縮機（Ｃｏｌｅ－Ｐａｒｍｅｒ）により、空気を流速４Ｌ／分で提供した。空気は、０．２μｍ　Ｍｉｄｉｓａｒｔ２０００フィルター（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　１７８０５）に通した。純粋酸素（Ｗｅｓｔ　Ａｉｒ）を自動的に供給して、溶存酸素レベルを７０％に制御した。Ｎｅｓｌａｂ　ＲＴＥ７循環機（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）により、温度を３０℃に制御した。消泡剤２０４（Ｓｉｇｍａ　Ａ８３１１）の添加により、泡立ちを制御した。発酵槽におけるＭ９ＹＥ培地の初期容量は、３Ｌであった。一晩３０℃、２５０ｒｐｍで育成した１５０ｍＬのシード培養物を発酵槽に接種した。器内のグルコースが枯渇したら、０．９ｍＬ／分に設定した蠕動ポンプにより、濃縮フィーディング溶液を器内に導入した。６００ｎｍにおける細胞の光学密度が約３０に達したら、０．５ｍＭ　ＩＰＴＧ（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　ＢＰ１７５５）で培養物を誘導した。培養物を一晩培養し（約１８時間フェドバッチ相）、６，０００×ｇにおける１時間の遠心分離により収集した。精製するまで細胞ペレットを－２０℃で貯蔵した。ＨｉｓＲＳの発現をＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいて確認した。

【０７０３】

ＨｉｓＲＳの精製。凍結した細胞ペースト（４０ｇ）を、１６０ｍＬ（即ち、４ｍＬ／

ｇ細胞ペースト）の溶菌緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、４００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、１４ｍＭ　β－ＭＥ、ｐＨ８．０、４℃）に再懸濁した。完全ＥＤＴＡフリーのプロテアーゼ阻害剤の錠剤（Ｒｏｃｈｅ）を、１錠剤／５０ｍＬの比でこの懸濁液に加えた。この懸濁液を、氷で冷却しつつ微小流体化装置（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）に１５，０００ｐｓｉで2回通した。ライセートを３５，０００×ｇで４５分間、４℃で遠心分離した。０．２２μｍ　Ａｃｒｏｐａｋ２００カプセルフィルター（Ｐａｌｌ）により上清を濾過した。

【０７０４】

清澄化したライセートを、Ｎｉ－ＮＴＡ結合緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、４００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　β－ＭＥ、ｐＨ８．０、４℃）で前平衡化したＮｉ－ＮＴＡ樹脂（Ｑｉａｇｅｎ）に結合させた。カラムを５００カラム容量のＮｉ－ＮＴＡ結合緩衝液＋０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１１４で洗浄し、続いて５０カラム容量のＮｉ－ＮＴＡ結合緩衝液で洗浄した。結合したタンパク質、ＨｉｓＲＳを5カラム容量のＮｉ－ＮＴＡ溶出緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、４００ｍＭ　ＮａＣｌ、５００ｍＭイミダゾール、５ｍＭ　β－ＭＥ、ｐＨ８．０、４℃）で溶出した。

【０７０５】

Ｎｉ－ＮＴＡ溶出液を陰イオン交換カラムによりさらに精製した。具体的には、Ｎｉ－ＮＴＡ溶出液を、Ｑ結合緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ７．４）に対して透析し、Ｑ結合緩衝液で前平衡化した５ｍＬのＱ－セファロースカラムにローディングした。１０カラム容量に及ぶＱ結合緩衝液における０～１Ｍ　ＮａＣｌの直線勾配により、所望の生成物をカラムから溶出した。精製ＨｉｓＲＳを濃縮し、緩衝液をＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ｐｒｏｄｕｃｔ＃１００１０）＋１ｍＭＤＴＴに交換し、０．２２μｍ無菌フィルターにより濾過した。

【０７０６】

（実施例３）

抗炎症剤としてのリゾカイン（ＨＲＳ（１～６０））の評価

【０７０７】

ＨＲＳ由来ポリペプチドの潜在的な抗炎症性性質を評価するため、結腸炎のＴＮＢＳ誘導モデル（Ｅｐｉｓｔｅｍ、Ｌｔｄ、ＵＫ）において、ＨＲＳのアミノ酸１～６０を含むＮ末端、天然起源のスプライスバリアント（リゾカイン）を検査した。

【０７０８】

最もよく見られる炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、クローン病および潰瘍性結腸炎は、消化管の慢性かつ進行性の炎症性障害である。クローン病は通常、回腸および結腸の両方に罹患するが、一方、潰瘍性結腸炎は通常、結腸および直腸の最深部内腔（lining）のみに罹患する。クローン病および潰瘍性結腸炎の症状は一般に、腹痛および下痢と同様のものである。中等度から重篤な潰瘍性結腸炎において、多くの場合血便が観察される。現在のところ、ＩＢＤの治癒法は存在しない。薬物および生物製剤は通例、症状の処置、寛解の誘導および再発の予防に使用される。スルファサラジン、メサラミンおよびコルチコステロイド等、抗炎症薬は多くの場合、寛解を誘導するためのＩＢＤの処置の第１選択（first line）薬物療法であるが、一方、免疫系抑制剤は一般に、寛解維持の補助に使用される。ＩＢＤの処置に使用される最もよく見られる免疫系モジュレーターは、アザチオプリン、メルカプトプリンおよび抗腫瘍壊死因子（抗ＴＮＦ－α）等の生物学的治療法である。

【０７０９】

ＩＢＤの動物モデルの開発は、ＩＢＤの治療法の理解および発見に寄与した。硫酸デキストラン（ＤＳＳ）およびトリニトロベンゼンスルホン酸（ＴＮＢＳ）結腸炎齧歯類モデルは、体重減少、結腸病理組織学および内視鏡検査スコアの重症度が、好中球およびマトリックスメタロプロテイナーゼの浸潤を優先的に誘引する炎症促進性サイトカインおよびケモカインの変化の程度に相当することを実証した。このようなＩＢＤ齧歯類モデルは、ＩＢＤの潜在的な新薬治療法を同定するための計算機アプローチの検証にも使用された。

【０７１０】

１２匹マウス／群による雄ＢＤＦ－１マウスにおいて試験を行った。処置群における全マウスに、結腸炎を誘導するために試験０日目に５０％エタノール／生理食塩水に溶解した３ｍｇ　ＴＮＢＳを結腸点滴注入により与え、陽性対照として、経口により５ｍｇ／ｋｇのブデソニドを加えた。

【０７１１】

本試験において、ＴＮＢＳ処置の３時間前に開始して、１または５ｍｇ／Ｋｇの濃度でＩＶ注射によりリゾカインを毎日投与した。図１に示すデータは、どちらの濃度のリゾカイン（ＨＲＳ（１～６０））処置も、生存の有意な増加をもたらすことを実証する。したがって、リゾカインは、強力な抗炎症性効果を有すると思われ、このことは、ＨＲＳポリペプチドが炎症過程の局所管理に関与するとの仮説と一貫した。

【０７１２】

直接的にＨＲＳ（１～５０６）に対しＨＲＳ（１～６０）を直接比較するため、Ｂｉｏｍｏｄｅｌｓ（ＭＡ、ＵＳＡ、Ｃ５７ＢＬ／６マウスによる）により反復的ＴＮＢＳ試験を行った。

【０７１３】

試験設計：処置なし対照群は、ＴＮＢＳのビヒクルを直腸内投与した５匹のマウスからなる（群１）。０日目に群２（１５匹マウス／群）および群３～７の１０匹マウス／群に、ＴＮＢＳ（４ｍｇ／１００μＬ　５０％エタノール）を投与した。－１～５日目に、群２および４～７にそれぞれ静脈内投与ｑ．ｄ．のビヒクル、３および１ｍｇ／ｋｇのＨＲＳ（１～５０６）ならびに５および１ｍｇ／ｋｇのａＴｙｒ１９２０を与えた。群３に、－１～５日目に、経口投与の２ｍｇ／ｋｇプレドニゾロンｑ．ｄ．を与えた。動物を毎日秤量した。全動物に対し、３および５日目にビデオ内視鏡検査を行って、結腸炎の程度と、いかなる有益な処置効果が観察できたかを評定した。生存動物は全て５日目に安楽死させて、重量および長さ測定ならびに病理学検査のために結腸組織を得た。

【０７１４】

方法：小動物内視鏡（Ｋａｒｌ　Ｓｔｏｒｚ　Ｅｎｄｏｓｋｏｐｅ、ドイツ）を用いて、盲検形式で内視鏡検査を行った。結腸炎重症度を評価するため、動物をイソフルランで麻酔し、下部結腸のビデオ内視鏡検査に付した。正常の０から重篤な潰瘍形成の４に及ぶ５段階評価で、結腸炎を視覚的にスコア化した。記述用語において、このスケールは、表Ｅ１に描写される通りに定義される。各マウスを、結腸全長を通じて観察された最も重篤な損傷に相当する単一スコアに割り当てた。５日目に動物を安楽死させ、その結腸を取り出し、リンスし、秤量し、その長さを測定した。

【０７１５】

【表Ｅ１】

表 E1.
内視鏡検査的結腸炎スコア化スケール

スコア	説明:
0	正常
1	血管新生(vascularity)の損失
2	血管新生の損失および脆さ
3	脆さおよびびらん
4	潰瘍形成および出血

【０７１６】

各動物の下５ｃｍにわたる結腸を調査するためこれをトリミングし、各端の２ｃｍ片を１０％ホルマリンにおいて固定し、包埋し、およそ５ミクロンに切片作製し、組織学的解析のためヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色することにより、組織学的に評定した。この結腸の中央１ｃｍ片は、手早く（snap）凍結し、－８０℃で貯蔵した。ＧＩ病理学における特定の専門知識を有する委員会（board）認証の獣医病理学者により、盲

検形式で組織切片を調査した。表Ｅ２に収載されている判断基準に従った５段階評価を使用して、炎症、浮腫および上皮壊死／損失に関して各切片をスコア化した。４切片それぞれのスコアを平均化して、パラメータ毎にマウス毎の単一平均スコアを得た。３種のパラメータスコアの合計である平均合計スコアも報告されている。

【０７１７】

【表Ｅ２】

表 E2 組織学的結腸炎スコア化スケール	
炎症	
スコア	説明
0	存在なし
1	病巣減多になし; 最小
2	散乱した凝集体または軽度びまん性炎症
3	多数の凝集体または中等度びまん性炎症
4	顕著なびまん性炎症
浮腫	
スコア	説明
0	存在なし
1	病巣減多になし; 最小
2	散乱した領域または軽度びまん性浮腫
3	多数の領域または中等度びまん性浮腫
4	顕著なびまん性浮腫
上皮壊死/損失	
スコア	説明
0	存在なし
1	＜25%の粘膜が罹患
2	26-50%の粘膜が罹患
3	51-75%の粘膜が罹患
4	＞76%の粘膜が罹患

【０７１８】

結果：全ＴＮＢＳ処置動物は、１日目に著しく体重を減らし、３または４日目に体重を再び増やし始めた。３および５日目に、１および３ｍｇ／ｋｇのＨＲＳ（１～５０６）または１および５ｍｇ／ｋｇのＨＲＳ（１～６０）による処置は、結腸炎スコアに軽度から中等度の減少を生じた（表Ｅ３）。３ｍｇ／ｋｇのＨＲＳ（１～５０６）による処置は、３および５日目の両方に、他の処置群と比較して結腸炎スコアに最大の減少を一貫して生じた（表Ｅ３）。２ｍｇ／ｋｇのプレドニゾロンによる処置は、５日目に結腸炎スコアに軽度の減少を生じたが、３日目に効果がなかった。１および３ｍｇ／ｋｇのＨＲＳ（１～５０６）または１および５ｍｇ／ｋｇのＨＲＳ（１～６０）による処置は、ＴＮＢＳ＋ビヒクルによる処置と比較して、炎症、浮腫、上皮壊死／損失および合計スコアの有意な減少をもたらした（表Ｅ３）。

【０７１９】

【表Ｅ３】

表E3
病理学スコアのまとめ

群	処置	平均スコア ± SEM			
		炎症	浮腫	壊死	合計
1	--	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.04
2	ビヒクル (i.v.)	0.68 ± 0.08	0.79 ± 0.10	0.43 ± 0.09	1.89 ± 0.20
3	プレドニゾロン 2 mg/kg (p.o.)	0.72 ± 0.14	0.71 ± 0.16	0.61 ± 0.15	2.05 ± 0.42
4	HRS (1-506) 3 mg/kg (i.v.)	0.37 ± 0.06	0.38 ± 0.08	0.27 ± 0.06	1.02 ± 0.15
5	HRS (1-506) 1 mg/kg (i.v.)	0.47 ± 0.08	0.48 ± 0.10	0.37 ± 0.07	1.32 ± 0.23
6	HRS (1-60) 5 mg/kg (i.v.)	0.50 ± 0.10	0.65 ± 0.16	0.35 ± 0.08	1.50 ± 0.30
7	HRS (1-60) 1 mg/kg (i.v.)	0.49 ± 0.08	0.52 ± 0.15	0.33 ± 0.06	1.34 ± 0.27

【０７２０】
結論：ＴＮＢＳ誘導性結腸炎のマウスモデルにおいて、１および５ｍｇ／ｋｇのＨＲＳ（１～６０）ならびに１および３ｍｇ／ｋｇのＨＲＳ（１～５０６）による静脈内処置は、内視鏡結腸炎スコアならびに炎症、浮腫、上皮壊死／損失および合計スコアの病理学スコアの有意な減少をもたらした。ＨＲＳ（１～６０）、ＨＲＳ（１～５０６）またはプレドニゾロンによる処置に起因する有害効果は存在しなかった。このような結果は、以前の試験を確認し、ＩＢＤ等、炎症性疾患および障害におけるＨＲＳポリペプチドの抗炎症性の役割をさらに確立する。

【０７２１】
（実施例４）
全長ＨＡＲＳにおけるシステイン残基の活性部位力価測定

【０７２２】
全長ＨＡＲＳにおける表面露出したシステイン残基の位置および同一性を決定するため、精製組換えタンパク質を、未変性および変性条件下でヨードアセトアミドと共にインキュベートして、いずれかの表面露出システイン残基をアルキル化した。次に、限定タンパク質分解により試料を解析し、続いてＬＣ質量分析して、修飾システイン残基の位置および同一性を決定した。

【０７２３】
アルキル化試験を行うため、４５分間、室温における１０ｍＭ　ＤＴＴとのインキュベーションにより、全長ポリヒスチジンタグ付きＨＲＳ（ＰＢＳ、１０％グリセロール、２ｍＭ　ＤＴＴ、ｐＨ７．４における６．６５ｍｇ／ｍｌ（実施例２））を先ず完全に還元した。３０ｍＭ（「低」）または１００ｍＭ（「高」）いずれかのヨードアセトアミド濃度による３０分間暗所におけるヨードアセトアミドとのインキュベーションを、ＨＡＲＳの未変性および変性試料において行って、反応が成功したことを確認した。４Ｍグアニジンとタンパク質の４５分間５０Ｃにおけるプレインキュベーションにより、変性ＨＡＲＳを調製した。ヨードアセトアミドとのインキュベーション後に、１０ＫＤａ分子量カットオフ透析膜を使用して、少なくとも３回緩衝液を交換しつつ、ＰＢＳ　ｐＨ７．４において４Ｃで試料を透析し、次に、後述の通り質量分光解析に使用した。

【０７２４】

要約すると、最終濃度１ｍ／ｍｌとなるよう０．１％ギ酸にタンパク質を希釈することにより試料を調製し、５μｇ試料のタンパク質を注射し、逆相ＨＰＬＣ、続いてＡｇｉｌｅｎｔ　ＴＯＦ質量分析計を使用した質量スペクトル解析により解析した。試料を先ず、直線勾配（２～６０％の移動相Ｂ）を使用して１８分間かけてＣ３　ＨＰＬＣカラム（Ａｇｉｌｅｎｔ　ＺＯＲＢＡＸ　３００ＳＢ－Ｃ３、５μｍ、２．１×１５０ｍｍカラム）において分離した（移動相Ａ：０．１％ギ酸；移動相Ｂ：アセトニトリルに溶解した０．１％ギ酸）。試料の質量分析による解析は、プロファイルモードで行った。データを取得し、ＭａｓｓＨｕｎｔｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ）により解析した。ＭａｓｓＨｕｎｔｅｒ　Ｂｉｏｃｏｎｆｉｒｍ（Ａｇｉｌｅｎｔ）により、測定された分子量を計算した。

【０７２５】

結果（データ図示せず）は、未変性条件下では、３または４個のシステイン残基のみが容易に修飾され、一方、比較すると、タンパク質が先ず変性されてその未変性立体構造が破壊された場合、全１０個のシステインが容易に変性されたことを実証した。

【０７２６】

修飾システイン残基の同一性を同定するため、ヨードアセトアミドとのインキュベーション前後の試料を、３７℃３０分間の４Ｍグアニジン－ＨＣｌにおける変性に付し、続いて室温２０時間における１０：１比（ｗ／ｗ）によるａを使用したＬｙｓＣによりタンパク質分解的に切断した。Ｄｉｏｎｅｘ　ＨＰＬＣおよびＴｈｅｒｍｏ　ＬＴＱ　ＸＬ質量分析計を使用したＬＣ／ＭＳ／ＭＳによりタンパク質消化物を解析した。移動相Ｂの勾配（移動相Ａ：０．１％ギ酸；移動相Ｂ：アセトニトリルに溶解した０．１％ギ酸）を使用してＣ１８　ＨＰＬＣカラム（Ａｇｉｌｅｎｔ　ＺＯＲＢＡＸ　３００ＳＢ－Ｃ１８、５μｍ、２．１×１５０ｍｍ）において試料を先ず分離した。勾配は、１～３％Ｂ、１０分間に始まり、続いて４０％Ｂ、７６分間であった。プロファイルモードのフルＭＳまたはフルＭＳスキャンのいずれかにより、分離されたタンパク質消化物を解析し、これを上位３種の同定されたイオンにおけるタンデムＭＳ／ＭＳスキャンにより解析した。データを取得し、Ｘｃａｌｉｂｕｒ（Ｔｈｅｒｍｏ）により解析した。ペプチド配列決定は、ｂおよびｙイオンピークがその理論上のイオンとマッチする各ペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに基づいた。ペプチドの同定および修飾部位のマッピングは、分子量に基づき、ＭＳ／ＭＳスペクトルを使用したペプチド配列決定により確認され、表Ｅ４に収載されている。

【０７２７】

【表Ｅ４】

表E4
限定トリプシン消化後のLC-MSペプチドマッピング結果

Cys残基	範囲	配列	RT（分）	MH+
Cys83	76-85	VFDVIIRCFK (配列番号190)	56.24	1239.68
Cys174 Cys191	155-193	VYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLK (配列番号191)	61.27	4673.14
Cys196	194-210	IMCEILSSLQIGDFLVK (配列番号192)	73.14	1909.01
Cys224	211-230	VNDRRILDGMFAICGVSDSK (配列番号193)	58.53	2196.08
Cys235	231-240	FRTICSSVDK (配列番号194)	22.8	1155.57
Cys235	231-243	FRTICSSVDKLDK (配列番号195)	28.77	1511.79
Cys379	377-403	VPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEK (配列番号196)	81.00	3013.63
Cys445	448-472	LLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQELK (配列番号197)	72.46	2784.48
Cys505 Cys509	500-509	RRTGQPLCICC (配列番号198)	27.17	1146.57

【０７２８】

結果は、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ５０７およびＣｙｓ５０９が、ヨードアセトアミド処理により容易に修飾され、よって、これらが化学修飾を容易に受け入れる表面露出残基となる可能性が高いことを明らかにした（データ図示せず）。

【０７２９】

（実施例５）

システイン含量が変更された修飾ＨＲＳポリペプチドの作製

【０７３０】

全長ＨＲＳにおける１０個の天然起源のシステイン残基のいずれが代替的な天然起源のアミノ酸残基に変異され得るかまたは欠失され得るか決定するため、各システイン残基を選択的に変異させるためのプライマーを設計した。これを達成するため、次に基づくプライマーを使用することができる（表Ｅ５を参照）。

【０７３１】

【表Ｅ５－１】

表E5		
変異	オリゴ配列	配列番号
C83	5'- GTTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAG-3' (前方向)	199
C83	5'- CTGCACCGTGGCGCTTGAAGCAACGGATGATTACGTCAAAC -3' (逆方向)	200
C174	5'- GCCGATACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGCTGGG-3' (前方向)	201
C174	5'- CCCAGCAATGTCAAAATCACACTGGTAGAATTCCCGGTATCGGC -3' (逆方向)	202
C191	5'- CCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAG-3' (前方向)	203
C191	5'- CTCGCACATGATCTTCAGGCACTCTGCATCAGGGATCATGG -3' (逆方向)	204
C196	5'- GCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTC-3' (前方向)	205

【表Ｅ５－２】

C196	5'- GAAGTGAACTCAGGATCTCGCACATGATCT TCAGGCACTCTG C -3' (逆方向)	206
C224	5'- CTAGATGGGATGTTTGCTATCTGTGGTGTTTCTGACAGCAAGTTC-3' (前方向)	207
C224	5'- GAACTTGCTGTCAGAAACACCACAGATAGCAAACATCCCATCTAG -3' (逆方向)	208
C235	5'- CAGCAAGTTCCGTACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGG-3' (前方向)	209
C235	5'- CCA GCT TGTCTACTGAGGAGCAGATGGTACGGAACTTGCTG -3'	210
C379	5'- GGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGG-3' (前方向)	211
C379	5'- CCC CAA TGC TGA GCC CCA CAC ATG GCA CCT TGC GCC C -3' (逆方向)	212
C455	5'- CTGAACCAGTTACAGTACTGTGAGGAGGCAGGCATCCC-3' (前方向)	213
C455	5'- GGGATGCCTGCCTCCTCACAGTACTGTAACTGG TTCAG -3' (逆方向)	214
C507	5'- GAGAACAGGCCAGCCCCTCTGCATCTGCTAGAACCCAGC-3' (前方向)	215
C507	5'- GCTGGGTTCTAGCAGATGCAGAGGGGCTGGCCTGTTCTC -3' (逆方向)	216
C509	5'- CCAGCCCCTCTGCATCTGCTAGAACCCAGCTTTCTTG-3' (前方向)	217
C509	5'- CAAGAAAGCTGGGTTCTAGCAGATGCAGAGGGGCTGG -3' (逆方向)	218
最後の3コドンの除去	5' GAACAGGCCAGCCCCTCTAGAACCCAGCTTTCTTG 3' (前方向)	219
最後の3コドンの除去	5'- CAAGAAAGCTGGGTTCTAGAGGGGCTGGCCTGT TC -3' (逆方向)	220

【０７３２】

活性部位力価測定データを確認するため、プログラムＧｅｔａｒｅａ１．１を用いて全長ＨＲＳの結晶構造を解析して、１０個のシステイン残基の相対位置を評定した。結果（データ図示せず）は、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ５０７およびＣｙｓ５０９に加えて、配列番号１のＣｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１およびＣｙｓ２２４の位置にあるシステインが、少なくとも部分的に表面に露出し、標準試薬により修飾される可能性が高くなり得ることを示唆する。その上、ＨＲＳの結晶構造の解析は、Ｃｙｓ１７４およびＣｙｓ１９１が、内部

ジスルフィド結合を形成することができ、一方、Ｃｙｓ５０７およびＣｙｓ５０９は、ＨＲＳ二量体内に鎖間ジスルフィド結合を形成することができ、両者共に、有益に排除され得る微小不均質性（micro-heterogeneity）に潜在的に寄与することを示唆する。

【０７３３】

鎖間ジスルフィド結合形成への寄与における２個のＣ末端システイン残基の有意性を直接的に評定するため、後述する還元前後のＳＤＳＰＡＧＥ解析により、Ｈｉｓタグ付きバージョンの全長およびＣ末端欠失バージョンのＨＲＳ（ＨＲＳ（１～５０６））を比較した。図２に示す結果は、全長ＨＲＳが、非共有結合およびＳＳ連結した二量体のほぼ５０：５０混合物であるが、ＨＲＳ（１～５０６）が、ＳＳ連結した二量体を劇的に低下させていることを実証する。後述する競合的ＥＬＩＳＡによる２種のタンパク質の比較は、両方のタンパク質が、Ｊｏ－１抗体結合に関して匹敵するＩＣ５０値を有することを明らかにした（データ図示せず）。ＨＲＳ（１～５０６）に関連する劇的に低下された鎖間ジスルフィド結合形成は、このバリアントが、改善された次世代の製品形態の開発に適した出発点であることを示唆する。

【０７３４】

全長ＨＲＳにおける残り４個の部分的に露出したシステイン残基のいずれが、代替的な天然起源のアミノ酸残基に変異され得るか決定するため、Ｃ１７４、Ｃ１９１、Ｃ２２４およびＣ２３５残基を選択的に変異するためのプライマーを設計した。これを達成するため、表Ｅ６に収載されている次のプライマーを使用した。

【０７３５】

【表Ｅ６】

表 E6

変異	オリゴ配列	配列番号
C191A	CCCGGATGCCGAGGCTTTGAAAATTATGTG (正方向)	221
C191A	CAC ATA ATT TTC AAA GCC TCG GCA TCC GGG (逆方向)	222
C191S	GATCCCGGATGCCGAGAGTTTGAAAATTATGTGTG (正方向)	223
C191S	CAC ACA TAA TTT TCA AAC TCT CGG CAT CCG GGA TC (逆方向)	224
C191V	GATCCCGGATGCCGAGGTTTTGAAAATTATGTGTG (正方向)	225
C191V	CAC ACA TAA TTT TCA AAA CCT CGG CAT CCG GGA TC (逆方向)	226
C174A	CGCGAATTCTATCAGGCTGATTTTGATATTGCCGG (正方向)	227
C174A	CCG GCA ATA TCA AAA TCA GCC TGA TAG AAT TCG CG (逆方向)	228
C174V	CGCGAATTCTATCAGGTTGATTTTGATATTGCCG (正方向)	229
C174V	CGG CAA TAT CAA AAT CAA CCT GAT AGA ATT CGC G (逆方向)	230
C224S	GGTATGTTTGCTATTTCCGGTGTTTCTGATTCC (正方向)	231
C224S	GGA ATC AGA AAC ACC GGA AAT AGC AAA CAT ACC (逆方向)	232
C235S	CCAAATTCCGTACAATCTCCTCAAGCGTGGACAAATTGG (正方向)	233
C235S	CCA ATT TGT CCA CGC TTG AGG AGA TTG TAC GGA ATT TGG (逆方向)	234
C191A	CCCGGATGCCGAGGCTTTGAAAATTATGTG (正方向)	235
C191A	CAC ATA ATT TTC AAA GCC TCG GCA TCC GGG (逆方向)	236

【０７３６】

メーカーの説明書に従って、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ部位特異的変異誘発キット（Ａｇｉｌｅｎｔ、ｃａｔ．ｎｏ．２１０５１８）を使用した変異誘発により変異を導入した。変異誘発後に、試料を３７℃にてＤｐｎ　Ｉ酵素で処理し、ルーチンの手順を使用してＸＬ１０ゴールド（gold）コンピテント細胞を形質転換した。テリフィック（terrific）ブロスにおいて一晩３７℃で複数のコロニーを育成し、得られたプラスミドをＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎミニプレップ（Miniprep）キット（Ｑｉａｇｅｎ　ｃａｔ．ｎｏ．２７１０６）により精製した。プラスミドを配列決定して、各クローンのアミ

ノ酸置換の同一性を確認した。代表的なクローンでＮｏｖａＢｌｕｅコンピテント細胞（Ｎｏｖａｇｅｎ　ｃａｔ．ｎｏ．７０１８１）を形質転換し、２５０ｍｌのＭ９ＹＥ培地において３７℃で一晩育成した。ＨｉＳｐｅｅｄプラスミドＭａｘｉキット（Ｑｉａｇｅｎ　ｃａｔ．ｎｏ．１２６６３）を使用してマキシプレップ（Maxiprep）を行って、さらなる解析のための変異体のプラスミドストックを作製した。Ａ２６０、Ａ２８０およびＡ２３０を測定することにより、濃度および純度を決定した。標準プロトコールに従ってＥ．ｃｏｌｉまたは哺乳動物細胞にトランスフェクションする前に、精製したプラスミドを－２０℃で貯蔵した。

【０７３７】

各残基の変異の変異の影響を評定するため、代表的なクローンでＥ．ｃｏｌｉまたは哺乳動物細胞を形質転換し、後述する通り、産生収率、エンドトキシン含量、安定性およびＪｏ－１抗体結合を決定するためのＥＬＩＳＡアッセイにおける相対活性を測定した。

【０７３８】

タンパク質産生。ＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテント細胞（Ｎｏｖａｇｅｎ、ｃａｔ．ｎｏ．６９４５０）またはＷ３１１０細胞（ＡＴＴＣ）を、上述のシステイン低下構築物をコードするコドン最適化された発現構築物で形質転換した。組換えタンパク質の産生に使用される発現系、発酵培地、発酵条件および精製ステップは、産生スケールおよび使用される細胞ペーストの量を調整した後に、後述する実施例６に記載されているものと本質的に同一である。下表Ｅ７は、作製されたタンパク質の精製収率およびエンドトキシンレベルを示す。

【０７３９】

【表Ｅ７】

表E7
システイン低下バリアントの精製収率およびエンドトキシンレベル

名称	収率 (mg/g細胞ペースト)	エンドトキシン(EU / mg)
全長HRS	++	3.2
HRS(1-506)	+++	0.32
HRS(1-506)C174V	++	0.71
HRS(1-506)C174A	++	0.30
HRS(1-506)C191A	++	0.46
HRS(1-506)C191V	+++	0.33
HRS(1-506)C191S	+++	0.32
HRS(1-506)C224S	++	0.54
HRS(1-506)C235S	+++	0.60

+++ 7mgタンパク質/g細胞ペーストより高い;
++ 5mg/g細胞ペーストより高い
+ 5mg/g細胞ペースト未満。

【０７４０】

結果は、Ｃｙｓ低下バリアントが全て、相対的に良好に発現され、低エンドトキシンレベルでの精製に成功したことを示す。全クローンが、合理的なレベルの発現および低エンドトキシンレベルを提示したが、特に、Ｃｙｓ１９１およびＣｙｓ２３５の変異に基づくシステイン低下バリアントは、好ましい発現レベルを表示した。全長ＨＲＳの発現と比較して、システイン修飾タンパク質は全て、有意に低いエンドトキシン含量を提示した。さらに、システイン低下変異体ＨＲＳ（１～５０６）、ＨＲＳ（１～５０６）Ｃ１９１Ｖ、ＨＲＳ（１～５０６）Ｃ１９１ＳおよびＨＲＳ（１～５０６）Ｃ２３５Ｓは全て、全長野生型ＨＡＲＳと比べて発現改善を示した。

【０７４１】

精製タンパク質の電荷不均質性におけるシステイン変異の影響を評定するため、等電点電気泳動法により各クローンの試料を解析した。Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｎｏｖｅｘ　ｐＨ３～１０　ＩＥＦゲル１．０ｍｍ（Ｃａｔ　Ｎｏ．Ｐ／Ｎ　ＥＣ６６４５ＢＯＸ）、Ｎｏｖｅｘ　ＩＥＦマーカー３～１０（Ｃａｔ　Ｎｏ．Ｐ／Ｎ　３９１２０１）、Ｎｏｖｅｘ　ｐＨ３～１０　ＩＥＦ緩衝液キット（Ｃａｔ．Ｎｏ．Ｐ／Ｎ　ＬＣ５

３１７）を使用して、等電点電気泳動（isolectric focusing）ゲル（ｐＨ３～１０）上に試料（１０μｇ）をローディングし、１×陰極緩衝液（上部チャンバー）および１×陽極緩衝液（下部チャンバー）を用いて、１００Ｖで１時間、２００Ｖで１時間および５００Ｖで３０分間泳動した。ゲルを１２％ＴＣＡと３．５％スルホサリチル酸で３０分間固定し、Ｅｘｐｅｄｅｏｎ ＩｎｓｔａｎｔＢｌｕｅ（Ｃａｔ Ｎｏ．Ｐ／Ｎ ＩＳＢ１Ｌ）で染色した。データ（結果示さず）は、１７４位におけるシステインの変異が、等電点不均質性を有意に低下させることを実証し、この結果は、このシステイン残基がシステイン１９１と分子内ジスルフィド結合形成を行う可能性と一貫した。

【０７４２】

得られたタンパク質の熱安定性、凝集傾向、構造およびｔＲＮＡ合成酵素活性におけるシステイン修飾の影響を評定するため、示差走査蛍光定量、分子ふるいＨＰＬＣ（ＳＥ－ＨＰＬＣ）、競合的ＥＬＩＳＡおよび活性部位力価測定によりタンパク質を評定した。結果を下表Ｅ８に示す。

【０７４３】

熱変性における親油性色素の蛍光強度の関数として蛍光をモニタリングすることにより、タンパク質試料における示差走査蛍光定量を行った。試料を０．５ｍｇ／ｍＬとなるよう１００μＬ最終容量のＰＢＳ、ｐＨ７．０（１５０ｍＭ ＮａＣｌ、２０ｍＭリン酸塩）に希釈し、ストック溶液（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｐ／Ｎ ４４６１１４６）を超高純度蒸留水（Ｇｉｂｃｏ、Ｐ／Ｎ １０９７７）において２０倍に希釈することにより調製した熱シフト色素溶液と混合した試料において試験を行った。希釈した色素の５μＬを１００μＬの試料に加えた。混合物を３８４ウェルクリアオプティカル反応プレート（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｐ／Ｎ ４３０９８４９）内に各ウェル２０μＬで蒔き、試料毎に４ウェル複製した。ＶｉｉＡ ７リアルタイムＰＣＲ機器（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｐ／Ｎ ４４５３５５２）により、プレートを読み取った。熱変性プロトコールは、変化速度１．６℃／秒で始まり、２５℃の温度に到達するまでこれを行い、到達したら機器はこの温度を２分間保持し、その後、０．５℃／秒の速度で温度を９９℃までさらに増加させ、到達したらこの温度をさらに２分間保持した。

【０７４４】

真空脱気装置（degasser）、２つ組（binary）／４つ組（quaternary）ポンプ、サーモスタット式オートサンプラー、サーモスタット式カラム区画、ダイオードアレイ検出器（ＤＡＤ）およびＣｈｅｍｓｔａｔｉｏｎクロマトグラフィーソフトウェア）を備えるＡｇｉｌｅｎｔ １２６０ ＨＰＬＣシステムにより、流速０．３ｍｌ／分で、２００ｍＭリン酸Ｎａ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、ｐＨ７．０の移動相を使用したＴＳＫｇｅｌ Ｓｕｐｅｒ ＳＷ３０００、４．６ｍｍ ＩＤ×３０ｃｍ、４μｍ粒子サイズ、２５０Åカラム（Ｔｏｓｏｈ、１８６７５）を使用して、精製タンパク質試料における分子ふるいＨＰＬＣ解析を完了した。短い遠心分離後に、各タンパク質の無希釈試料（４０μｇ）を注射した。システム適合性試料（ウシ血清アルブミン、ＢＳＡ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｐ／Ｎ：２３２０９）および内部対照（野生型ＨＲＳ）を、検査の妥当性を確保するためのブラケット試料に使用した。

【０７４５】

２μｇ／ｍＬの濃度となるようＰＢＳで調整した５０μＬの全長ｈｉｓタグ付きＨＡＲＳ溶液でコーティングした９６ウェルプレート（Ｉｍｍｕｌｏｎ ４ＨＢＸ）において、競合的ＥＬＩＳＡを行った。プレートを密封し、一晩４℃でインキュベートした。使用前に、プレートをＰＢＳＴで５回洗浄し、その後、ＰＢＳに溶解した１００μｌの１％ＢＳＡで１時間室温にてブロッキングした。ＥＬＩＳＡプレートをブロッキングしつつ、別々のインキュベーションプレート（Ｃｏｓｔａｒ ３３５７ ９６ウェル）において、１時間４℃で、システイン低下競合分子（1×10^{-6}Ｍ～1×10^{-13}Ｍの濃度範囲に及ぶ）を、１％ＢＳＡ ＰＢＳにおいて１：１０，０００希釈したα－Ｊｏ－１抗体（Ｇｅ

ｎＷａｙ　ＧＷＢ－ＦＢ７Ａ３ＤまたはＩｍｍｕｎｏｖｉｓｉｏｎ　ＨＪＯ－０１００）と共にインキュベートした。ブロッキングを終了した後、ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、抗体および競合体を含有する５０μＬの溶液をＥＬＩＳＡプレートに加え、試料を室温で１．５時間インキュベートした。初回結合インキュベーション後に、プレートをＰＢＳＴで５回洗浄した。次に、１：５，０００希釈の５０μＬの検出抗体（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆ（ａｂ’）２：ＨＲＰ　０５００－００９９）を加え、１時間室温でインキュベートした。二次結合インキュベーション後に、プレートをＰＢＳＴで５回洗浄し、５０μＬのＴＭＢ基質（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｉｅｒｃｅ　ＴＭＢ基質ＰＩ－３４０２１）を加えた。反応を８分間進め、その時点で５０μＬの２Ｍ硫酸停止溶液を加えた。４５０ｎＭにおけるＳｐｅｃｔｒａＭａｘプレートリーダーを使用して比色定量化を行った。

【０７４６】

各ＨＡＲＳ５０６システインバリアントにおける触媒活性部位の数を決定するため、活性部位力価測定アッセイ（Fershtら、（１９７５年）Biochemistryに記載）を用いた。簡潔に説明すると、標準緩衝液（１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．５、２０ｍＭ　ＫＣｌ）における５μＭ　ＨＡＲＳ、１０ｍＭ　ＭｇＣｌ２、５０μＭ　ＡＴＰ、２０ｍＭ　Ｌ－ヒスチジン、２ｕｇ／ｍＬ無機ピロホスファターゼ、１．６５μＭ［γ－３２Ｐ］ＡＴＰにより、室温でアッセイを行った。低プロファイルＰＣＲプレートにおいて酵素により反応を開始し、ＨＣｌＯ４／チャコールスラリー（１：４　７％ＨＣｌＯ４：１０％チャコールスラリー）を含有する９６ウェルＰＶＤＦマルチスクリーニングフィルタープレートＭｉｌｌｉｐｏｒｅにおいて、３０秒、１分、２分、４分、６分および１０分目にクエンチした。ピペッティングで出し入れして混合した後、Ｓｕｐｅｒｍｉｘシンチラント（scintillant）を備える収集プレートに試料をスピンし、Ｍｉｃｒｏｂｅｔａｅプレートリーダーにおいて計数した。

【０７４７】

【表Ｅ８】

表E8
HARSの熱安定性、凝集および活性におけるシステイン修飾の効果

名称	Tm	低分子量凝集体%	高分子量凝集体%	ELISAアッセイによるIC50	活性部位力価測定
全長HRS		1.2	7.0	0.2	ND
HRS(1-506)	49.0	2.0	0.2	0.15	63.3
HRS(1-506)C174V	47.8	7.8	0.4	0.39	55.5
HRS(1-506)C174A	49.2	3.0	0.8	0.19	59.8
HRS(1-506)C191A	44.7	5.1	0.3	0.14	66.2
HRS(1-506)C191V	47.8	1.8	0.2	0.16	60.8
HRS(1-506)C191S	45.8	2.3	0.3	0.16	63.2
HRS(1-506)C224S	48.9	4.9	0.5	0.14	60.5
HRS(1-506)C235S	48,8	3.1	0.42	0.14	64.6

【０７４８】

これらの試験から得られた結果は、システイン変異体が全て活性を有し、活性部位力価測定、ＥＬＩＳＡ結合および熱変性のＴｍ決定により測定される活性、安定性または立体構造における損失が殆どないまたは全くないことを確認する。ｔＲＮＡ合成酵素活性の活性部位力価測定は、システイン低下変異体が全て活性を有し、よって、本発明の組成物、方法およびキットのいずれかにおける使用に適していることを明らかにした。一般に、Ｃｙｓ１９１置換は、全体的により低い熱安定性を表示したが、Ｃｙｓ１７４変異体は、等電点電気泳動法により決定される有意に低い不均質性を提示した。

【０７４９】

（実施例６）

Ｃ末端トランケーションを有する修飾ＨＲＳポリペプチド（ＨｉｓＲＳ^{N8}）の作製

最後の３アミノ酸および野生型ＨｉｓＲＳとＨｉｓタグとの間のリンカーを欠失させるため、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ部位特異的変異誘発キット（Ａｇｉｌｅｎｔ、ｃａｔ　ｎｏ　２１０５１９）による使用のためのプライマーを設計した。これを達成するため、表Ｅ９に収載されている次のプライマーを使用した。

【表Ｅ９】

表 E9

配列番号	オリゴ配列	変異
Delete CICAAALE For	5’-CGCCGCACCGGTCAACCGTTACACCACCACCACCACCACTG-3’	66
Delete CICAAALE Rev	5’- CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGT AAC GGT TGA CCG GTG CGG CG -3’	67

【０７５０】

ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ部位特異的変異誘発キットのメーカーの説明書に従って欠失を作製した。変異誘発後に、試料を３７℃にてＤｐｎ　Ｉ酵素で処理し、ルーチン手順を使用してＸＬ１０ゴールドコンピテント細胞を形質転換した。複数のコロニーをルリア・ベルターニ（luria-bertani）ブロスにおいて一晩３７℃で育成し、ＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎミニプレップキット（Ｑｉａｇｅｎ　ｃａｔ．ｎｏ．２７１０６）により、得られたプラスミドを精製した。プラスミドを配列決定して、各クローンのアミノ酸置換の同一性を確認した。Ｈｉｓタグを欠失させるため、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ部位特異的変異誘発キット（Ａｇｉｌｅｎｔ、ｃａｔ　ｎｏ　２１０５１９）による使用のためのプライマーを設計した。これを達成するため、表Ｅ１０に収載されている次のプライマーを使用した。

【表Ｅ１０】

表 E10

変異	オリゴ配列	配列番号
Delete His-tag For	5’- CGC CGC ACC GGT CAA CCG TTA TGA GAT CCG GCT GCT AAC -3’	68
Delete His-tag Rev	5’- GTT AGC AGC CGG ATC TCA TAA CGG TTG ACC GGT GCG GCG -3’	69

【０７５１】

上述の通り、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ部位特異的変異誘発キットのメーカーの説明書に従って欠失を作製した。

【０７５２】

タンパク質産生。実施例２に記載されている通り、ＢＬ２１（ＤＥ３）コンピテント細胞（Ｎｏｖａｇｅｎ、ｃａｔ．ｎｏ．６９４５０）またはＷ３１１０細胞（ＡＴＴＣ）を、ＨｉｓＲＳ^{N8}（ＨＲＳ（１～５０６））をコードするコドン最適化した発現構築物により形質転換した。組換えタンパク質の産生に使用した発現系、発酵培地および発酵条件は、実施例２に記載されているものと本質的に同一である。

【０７５３】

タグフリーＨｉｓＲＳ^{N8}（ＨｉｓＲＳ（１～５０６））の精製。凍結した細胞ペースト（４００ｇ）を、４容量（１６００ｍＬ）の溶菌緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　$MgCl_2$、２ｍＭ　Ｌ－システイン、ｐＨ７．４）に再懸濁した。完全ＥＤＴＡフリーのプロテアーゼ阻害剤の錠剤（Ｒｏｃｈｅ、Ｃａｔ＃０５　０５６　４８９　００１）を、１錠剤／５０ｍＬの比で懸濁液に加えた。この懸濁液を、氷で冷却しつつ１８，０００ｐｓｉで微小流体化装置（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ）に２回通した。ライセートを１５，０００×ｇにて４５分間、４℃で遠心分離した。２～３個のＡｃｒｏＰａｋ　１５００カプセル（０．８／０．２μｍ、Ｐａｌｌ、ＰＮ１２６７５）により上清を濾過した。

【０７５４】
清澄化したライセートを、Ｑ緩衝液Ａ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で前平衡化した３８２ｍｌのＱ　ＨＰカラム（５×１９．５ｃｍ）にローディングした。１０カラム容量（ＣＶ）に及ぶ０～３０％Ｑ緩衝液Ｂ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）の直線勾配により、生成物を溶出した。$^{1}/_{2}$ＣＶ／画分において画分を収集し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより解析した。プール作製は、ゲル解析に基づいた。
【０７５５】
３．５Ｍ硫酸アンモニウム溶液を、最終濃度１．２Ｍとなるよう上述のＱ　ＨＰプールに加えた。ＡｃｒｏＰａｋ　２００（０．２ｕｍ）により混合物を濾過し、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１．２Ｍ硫酸アンモニウム、ｐＨ７．０で前平衡化した４８１ｍｌのＰｈｅｎｙｌ　ＨＰカラム（５×２４．５ｃｍ）にローディングした。１０ＣＶに及ぶ２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／ｐＨ７．０に溶解した１．２～０Ｍ硫酸アンモニウムの直線勾配により、生成物を溶出した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析に基づき生成物を含有する画分（$^{1}/_{2}$ＣＶ／画分）をプールした。
【０７５６】
Ｐｅｌｌｉｃｏｎ　Ｍｉｎｉカセットホルダー（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃａｔ＃ＸＸ４２ＰＭＩＮＩ）、Ｍａｓｔｅｒｆｌｅｘ　Ｉ／Ｐポンプおよび２×０．１ｍ^{2}カセット（３０ｋＤ　ＭＷＣＯ、Ｎｏｖａｓｅｐ　Ｃａｔ＃ＰＰ０３０Ｍ０１Ｌ）からなるＴＦＦシステムにより、上述のＰｈｅｎｙｌプールを０．５Ｌまで濃縮した。次に、濃縮した溶液を、６ダイアボリューム（diavolume）（３Ｌ）のＣＨＴ緩衝液Ａ（１０ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）に緩衝液交換した。次のステップに進む前に、０．２μｍ　Ｍｉｌｌｅｘ　ＧＰ－５０フィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ｐａｒｔ＃ＳＬＧＰ　０５０１０）により残留液（retentate）を濾過した。
【０７５７】
上述の溶液を、ＣＨＴ緩衝液Ａで前平衡化した３８０ｍｌのセラミックヒドロキシアパタイト（ＣＨＴ）カラム（５×１９．４ｃｍ）にローディングした。カラムを緩衝液Ａ、続いて６％緩衝液Ｂ（５００ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）で洗浄した。１０ＣＶに及ぶ６～５６％緩衝液Ｂの直線勾配により、生成物を溶出した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析に基づき生成物を含有する画分（$^{1}/_{2}$ＣＶ／画分）をプールした。
【０７５８】
同一ＴＦＦシステムを使用して、ほぼ０．２ＬまでＣＨＴプールを濃縮し、６ダイアボリュームの本製剤緩衝液（２０ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）に緩衝液を交換し、ほぼ１０ｍｇ／ｍｌの標的濃度まで濃縮した。０．２μｍ　Ｍｉｌｌｅｘ　ＧＰ－５０フィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ｐａｒｔ＃ＳＬＧＰ　０５０１０）により生成物溶液を濾過し、－８０℃の冷凍庫において貯蔵した。
【０７５９】
（実施例７）
ヒト患者試料由来の抗ＪＯ－１抗体に結合するためのＨＲＳポリペプチドの評価
【０７６０】
９６ウェルプレート（Ｉｍｍｕｌｏｎ　４ＨＢＸ）を、ＰＢＳで２μｇ／ｍＬの濃度となるよう調整した５０μＬ溶液のタンパク質でコーティングした。プレートを密封し、一晩４℃でインキュベートした。使用前に、プレートをＰＢＳＴで５回洗浄し、その後、ＰＢＳに溶解した１００μｌの１％ＢＳＡで１時間室温にてブロッキングした。ＥＬＩＳＡプレートをブロッキングしつつ、別々のインキュベーションプレート（Ｃｏｓｔａｒ　３３５７　９６ウェル）において、１％ＢＳＡ　ＰＢＳにおける様々な希釈の市販のα－Ｊｏ－１抗体（ＧｅｎＷａｙ　ＧＷＢ－ＦＢ７Ａ３Ｄ、Ｉｍｍｕｎｏｖｉｓｉｏｎ　ＨＪＯ－０１００またはＲＤＬ）と共に競合分子を１時間４℃でインキュベートした。ブロッキングが終了した後、ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、抗体および競合体を含

有する５０μＬの溶液をＥＬＩＳＡプレートに加え、試料を室温で１．５時間インキュベートした。初回結合インキュベーション後に、プレートをＰＢＳＴで５回洗浄した。次に、１：５，０００希釈の５０μＬの検出抗体（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆ（ａｂ’）２：ＨＲＰ　０５００－００９９）を加え、１時間室温でインキュベートした。二次結合インキュベーション後に、プレートを５回ＰＢＳＴで洗浄し、５０μＬＴＭＢ基質（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｉｅｒｃｅ　ＴＭＢ基質ＰＩ－３４０２１）を加えた。反応を８分間進め、その時点で５０μＬの２Ｍ硫酸停止溶液を加えた。４５０ｎＭにおけるＳｐｅｃｔｒａＭａｘプレートリーダーを使用して比色定量化を行った。

【０７６１】

全長ＨＲＳと比較したＨｉｓＲＳ^{N8}（ＨＲＳ１～５０６）（図５）、全長ＨＲＳと比較したリゾカイン（ＨｉｓＲＳ^{N4}：ＨＲＳ（１～６０））（図４）および様々な希釈に及ぶ血清と共にインキュベートした全長ＨＲＳ（図３）の競合的ＥＬＩＳＡの代表的な結果を示す。データは、ＨｉｓＲＳ^{N8}および全長ＨＲＳが、抗Ｊｏ－１抗体を有する炎症性ミオパチーおよび／または間質性肺疾患のヒト患者試料由来の抗Ｊｏ－１抗体の結合に対し競合することができるが、リゾカインは競合できないことを示す。よって、ＨｉｓＲＳ^{N8}および全長ＨＲＳの両方は、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連する疾患を有するヒト臨床試料由来の抗Ｊｏ－１抗体と競合し、その活性を遮断するための実行可能な戦略を提供する。

【０７６２】

その上、データは、驚くべきことに、全長ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素がプレートの表面に付着される場合、上述の条件下におけるリゾカイン（ＨｉｓＲＳ^{N4}）が、抗Ｊｏ－１抗体と有意に交差反応せず、約１×１０$^{-7}$Ｍを超える濃度で存在するまで有意に競合しないことを示す。よって、潜在的に循環抗Ｊｏ－１抗体との有意な交差反応性の原因とならない抗炎症性効果を媒介するために、リゾカイン（ＨｉｓＲＳ^{N4}）を患者に投与することができる。

【０７６３】

この観察をさらに探索するため、伝統的な力価測定ＥＬＩＳＡを使用して追加的な競合試験を行った（図６）。結果は、ＨｉｓＲＳ^{N4}または本質的に全長ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素が、プレートの表面に付着される場合、抗Ｊｏ－１抗体の結合曲線がほぼ匹敵することを示し、この結果は、アビディティまたは他の効果が、競合的ＥＬＩＳＡアッセイにおいて観察される明らかな差に有意に寄与し得ることを示唆する。

【０７６４】

（実施例８）

抗ＪＯ－１抗体エピトープ特異性の評価

【０７６５】

種々の患者由来の抗Ｊｏ－１抗体のエピトープ特異性を評価するため、ＲＤＬ（カリフォルニア州）から血清試料を得て、枯渇ＥＬＩＳＡアプローチによりスクリーニングして、試料の相対的な抗体特異性を同定した。

【０７６６】

要約すると、先に記載されている通り、実施例２に記載されている通りＥ．ｃｏｌｉにおいて発現および精製された、図７に収載されているＨｉｓタグ付けしたタンパク質試料によりＥＬＩＳＡプレートをセットアップした。上に収載されている（実施例５を参照）タンパク質を含有するＥＬＩＳＡプレートにおいて、試料を先ずインキュベートし、次に本質的に全長ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素が結合した新たなＥＬＩＳＡプレートに上清を移した。枯渇前後の抗体力価を比較することにより、各タンパク質構築物に特異的な抗Ｊｏ－１抗体結合の一部を計算することが可能になる。

【０７６７】

図８に示すデータは、ＷＨＥＰドメイン領域（１～６０）とタンパク質の残りの一部（ｄＷＨＥＰ）の両方に対し幅広い範囲の抗体特異性を示す。

【０７６８】
（実施例９）
ＨＲＳポリペプチドによるＪＯ－１抗体の体外除去
【０７６９】
患者血清から抗ＨＲＳ抗体（例えば、抗Ｊｏ－１抗体）を有効に免疫枯渇するためにＨＲＳポリペプチドを使用することができるか評価するため、ＨＲＳ（１～５０６）およびＨＲＳ（１～６０）の試料を固体支持体に固定化し、次に血清と接触させて、血清試料から抗ＨＲＳ抗体を免疫枯渇することができるか決定した。親和性カラムへのアプライ前後に抗Ｊｏ－１抗体力価を測定して、抗Ｊｏ－１抗体を除去するＨＲＳポリペプチドそれぞれの能力を評定した。
【０７７０】
ＨＲＳポリペプチドの固定化およびＪｏ－１抗体枯渇。メーカーの推奨するところ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ａｆｆｉ－ｇｅｌ　１０カタログ＃１５３－６０４６）に従ってＮ－ヒドロキシ－スクシンイミド（ＮＨＳ）架橋化学を使用して、全長ＨＡＲＳ、ＨＲＳ（１～５０６）、ＨＲＳ（１～６０）およびウシ血清アルブミンをアガロースゲルに固定化した。樹脂１ｍＬ当たりタンパク質２ｍｇの比をコンジュゲーションに使用した。商業的プロバイダ（ＲＤＬ、カリフォルニア州ロサンゼルス）から得られるヒト抗Ｊｏ－１抗体を、１：１，０００に希釈し、次に、上述の通り調製された固定化ＨＲＳポリペプチドアガロースコンジュゲートのそれぞれで作製されたカラムに試料を流した。後述する親和性カラムを通す前後にＪｏ－１抗体力価を決定した。
【０７７１】
Ｊｏ－１抗体力価測定。９６ウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｍｍｕｌｏｎ　４　ＨＢＸプレート、カタログ＃６４８４）を、ＰＢＳにおける２ｍｃｇ／ｍＬ濃度のＨｉｓＲＳ１で一晩４℃にてコーティングした。翌日、プレートをＰＢＳＴで洗浄し、ＰＢＳに希釈した１％ＢＳＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ＃１５２６０）で１時間室温にてブロッキングした。次に、プレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、Ｊｏ－１抗体を含有する試料で１．５時間３７℃にてインキュベートした。次に、プレートを再度ＰＢＳＴで３回洗浄し、二次抗体（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃヤギ抗ヒトＩｇＧ、カタログ＃０５００－００９９）と共にインキュベートし、１時間室温でインキュベートした。次に、プレートを再度ＰＢＳＴで３回洗浄し、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質（Ｔｈｅｒｍｏ　ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ＃３４０２１）と共に５分間インキュベートし、２Ｍ硫酸を加え、混合して反応を停止した。次に、プレートを４５０ｎＭで読み取り、相対抗体力価を決定した。
【０７７２】
結果（図９）は、全長ＨＡＲＳおよびＨＲＳ（１～５０６）の両方が、ヒト血清試料からのＪｏ－１抗体の免疫枯渇に有効であることを明らかにした。驚くべきことに、ＨＲＳ（１～５０６）は、１回の親和性樹脂通過により、検出可能なＪｏ－１抗体の最大９９％を除去することができたが、一方、全長ＨＡＲＳは、同一条件下で検出可能な抗体の約９３％のみを除去することができた。以前の試験と一貫して、ＨＡＲＳのより小さい断片、ＨＲＳ（１～６０）の使用は、検出可能なＪｏ－１抗体の約２０％しか枯渇させることができず、このＨＲＳポリペプチドが循環Ｊｏ－１抗体の特異的亜集団の選択的除去に有用となり得ることを示唆した。
【０７７３】
（実施例１０）
スタチン誘導性筋炎および横紋筋融解症の処置に対するＨＲＳポリペプチドの評価
【０７７４】
スタチンは、コレステロール合成における速度制限ステップである、メバロナートの合成を阻害するＨＭＧ　ＣｏＡ還元酵素阻害剤である。スタチン療法は、患者におけるコレステロールレベルを低めるのに有益であることが判明した。しかし、スタチン療法の副作用および合併症は、筋衰弱、筋炎および横紋筋融解症を含む。筋肉ミオパチーは、市場に

おける数種のスタチンによる合併症であり、患者は、これらの症状のいずれかを提示する場合、スタチン療法から除去されることが多い。多くの他のミオパチー、筋ジストロフィーおよび筋肉の炎症性障害と同様に、スタチン誘導性ミオパチーにおける疾患進行は、損傷した筋肉細胞への免疫細胞浸潤の結果ますます炎症するようになる初期化学的、遺伝的または物理的傷害の結果として生じると思われる。

【０７７５】

したがって、スタチン誘導性ミオパチーは、薬物誘導性筋炎を試験するために幅広く適用できるモデル系を表し、この系は、その全てが損傷筋組織の免疫細胞浸潤を促進することにより疾患進行を媒介する共通の炎症性構成成分を共有する、他のミオパチーおよび筋ジストロフィーに直接適用できる。

【０７７６】

本試験の目的は、ＨＲＳ（１～５０６）による処置に応答して変更された循環酵素レベルならびに筋肉機能および炎症性マーカーの遺伝子発現の変化により示される、スタチン誘導性筋肉の筋炎の効果の逆転におけるＨＲＳ（１～５０６）の効力を評価することである。

【０７７７】

これを達成するため、ラットに１ｍｇ／ｋｇセリバスタチン（Cerivastatin）を毎日投薬し、次いでセリバスタチンの一日おきの（ｑｏｄ）投薬にスイッチした。この投薬レジメンの目標は、動物における持続的な疾患状況を維持するが、ラット生存が大いに影響されるような重篤な疾患とならないことである。次に、スタチン投薬が筋炎の循環マーカーにおける測定可能な変化を既に惹起した後に、ラットにおけるＨＲＳ（１～５０６）の用量範囲の効力を評価した。

【０７７８】

プロトコールおよび方法。本試験において、１０週齢の雌スプラーグドーリー（Sprague-Dawley）ラットを、１日目に開始して経口経管栄養により、０．５％メチルセルロースに溶解した１ｍｇ／ｋｇセリバスタチン（（Ｓｉｇｍａ、Ｃａｔ　Ｎｏ．ＳＭＬ０００５）で処置した。７日間毎日投与した後、９、１１および１３日目にラットを一日おきの投薬戦略（ｑｏｄ）にスイッチした。６日目に静脈内注射によりＨＲＳ（１～５０６）およびビヒクル投与を開始し、ラットに１４日目まで毎日投薬した（図１０Ａに模式的に示す）。最終被験物投薬の２４時間後、最後のスタチン投与の４８時間後である１５日目に全ラットを解体した（take　down）。２０ｍＭ　ＮａＰＯ４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０に溶解した３種の用量（０．３、１．０および３．０ｍｇ／ｋｇ）でＨＲＳ（１～５０６）を毎日投与した。

【０７７９】

本試験の主目的に取り組むため、次の試験測定値およびエンドポイントを行った。ラット生存、体重、１２および１５日目における循環血清ＣＫレベル、１５日目の大腿屈筋試料におけるＨ＆Ｅ染色、トロポニン－Ｉ　ＥＬＩＳＡ、１５日目の血液におけるＣＢＣ、大腿屈筋試料におけるｑＰＣＲならびに血清内在性ＨＡＲＳレベル。

【０７８０】

ｑＰＣＲ方法。動物からマウス大腿屈筋を切除し、解析まで－８０℃にて貯蔵した。ＱｉａｇｅｎのＲＮｅａｓｙ　Ｆｉｂｒｏｕｓ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｍｉｄｉキット（カタログ＃７５７４２）を使用して、１０種の大腿屈筋群において組織を調製した。Ｑｉａｇｅｎカラムからの ＲＮＡを溶出したら、これをＡｇｉｌｅｎｔのＢｉｏａｎａｌｙｚｅｒ　２１００にかけてＲＮＡ統合性を検査し、ＮａｎｏＤｒｏｐにかけてＲＮＡ濃度および純度を決定した。次に、ＲＮＡを－８０℃にて貯蔵した。

【０７８１】

ＥｐｐｅｎｄｏｒｆのＭａｓｔｅｒｃｙｃｌｅｒ　ＰＣＲ機械における９６ウェルＰＣＲプレートフォーマットにおいて、次のプログラムによりＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写（ＲＴ）した。３７℃６０分間、９５℃５分間。９６ウェルプレートの縁側のウェルは使用せず、５０ｍｃＬの水を満たして、内側のウェルの蒸発を予防した。試料ＲＴ毎に、２０ｍ

ｃＬのＲＮＡおよび３０ｍｃＬの逆転写マスターミックス（ＡｍｂｉｏｎのＴａｑＭａｎ　ＰｒｅＡｍｐ　Ｃｅｌｌｓ　ｔｏ　ＣＴキット、カタログ＃４３８７２９９）を使用した。ＲＴが完了したら、次のステップは、試料ｃＤＮＡにおける目的の遺伝子の前増幅である。目的の遺伝子のプライマー（Ｆｌｕｉｄｉｇｍにより設計されたＤＥＬＴＡｇｅｎｅプライマー）を最終濃度２００ｎＭとなるよう組み合わせた。これらのプライマーを使用して、各試料における目的の遺伝子を前増幅した。Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　ＶｉｉＡ７　ＰＣＲ機械を使用して、３８４ウェルフォーマットにおいて１０ｍｃＬ反応液（２．５ｍｃＬのｃＤＮＡ、７．５ｍｃＬのＰｒｅ－Ａｍｐマスターミックス）において次のプログラムにより前増幅を行った。９５℃１０分間、１４サイクルの９５℃１５秒間および６０℃４分間。前増幅ステップ後に、エキソヌクレアーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓカタログ＃Ｍ０２９３Ｌ）を加えて、各試料から取り込まれなかったプライマーを除去した。ＶｉｉＡ７　ＰＣＲ機械において、次のプログラムによりこのエキソヌクレアーゼ反応も完了した。３７℃３０分間、８０℃１５分間。エキソヌクレアーゼ後に、ＲＴ試料をさらに１：５希釈した（７ｍｃＬエキソヌクレアーゼ試料＋１８ｍｃＬ低ＥＤＴＡ緩衝液）。

【０７８２】

ＦｌｕｉｄｉｇｍのＢｉｏｍａｒｋシステムにおけるｑＰＣＲの実施に使用したチップは、遺伝子発現のための９６．９６　ＤｙｎａｍｉｃアレイＩＦＣであった。試料およびアッセイをローディングする前に、メーカーの推奨するところに従って、ＩＦＣコントローラＨＸによりチップを先ず準備した。チップにローディングされるアッセイを調製するために、４．４ｍｃＬのアッセイマスターミックス（Ｆｌｕｉｄｉｇｍの２×アッセイローディング試薬、カタログ＃８５００７３６および低ＥＤＴＡ　ＴＥ）ならびに各目的の遺伝子の３．６ｍｃＬの２０ｍｃＭフォワードおよびリバースプライマーを、９６ウェルプレートにおいて調製した。試料を調製するため、４．５ｍｃＬの試料マスターミックス（Ａｍｂｉｏｎの２×ＴａｑＭａｎ遺伝子発現マスターミックス、Ｆｌｕｉｄｉｇｍの２０×ＤＮＡ結合色素試料ローディング試薬、カタログ番号１００－０３８８およびＢｉｏｔｉｕｍの２０×ＥｖａＧｒｅｅｎ、カタログ＃３１０００）を、９６ウェルプレートにおける３ｍｃＬの希釈前増幅／エキソヌクレアーゼ試料に加えた。チップが準備できたら、先に調製された５ｍｃＬの試料またはアッセイをチップにローディングした。次に、試料をチップにローディングするために、チップをＩＦＣコントローラに戻した。チップのローディングが終了した後、遺伝子発現のための９６．９６　Ｄｙｎａｍｉｃアレイのためのプリセットプログラムを使用したＢｉｏｍａｒｋにおいて融解曲線によりｑＰＣＲを行って、プライマー特異性を決定することができる。デルターデルタＣｔ方法により、相対的遺伝子発現を決定した。

【０７８３】

細胞外ＨＡＲＳの定量化。２種のマウス抗ＨＡＲＳモノクローナル抗体Ｍ０３（Ｓｉｇｍａ＃ＳＡＢ１４０３９０５およびＡｂｎｏｖａ＃Ｈ０００００３０３５－Ｍ０３）およびＭ０１（Ａｂｇｅｎｔ＃ＡＴ２３１７ａ）を使用してサンドイッチフォーマットで、９６ウェルに基づくＥＬＩＳＡを施設内（in-house）で開発して、ラット血清におけるＨＡＲＳを検出した。ＨＲＳ（１～５０６）のストック溶液（２０ｍＭ　ＮａＰＯ４、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０における７．５ｍｇ／ｍｌ、１×ＰＢＳＴ（０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）を希釈液として使用）を使用して７５～０．１ｎｇ／ｍｌにわたり作成した７点検量線を使用して、９６ウェルＣｏｓｔａｒプレート（Ｃｏｓｔａｒ　９６ウェルプレート＃３３６９）においてアッセイを行った。Ｍ０１マウスモノクローナル、クローン１Ｃ８（Ａｂｇｅｎｔ＃ＡＴ２３１７ａ）を施設内でビオチン化し、検出抗体として使用し、Ｍ０３マウスモノクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ＃ＳＡＢ１４０３９０５、ｌｏｔ＃１１２３８、０．５ｍｇ／ｍＬおよびＡｂｎｏｖａ＃Ｈ０００００３０３５－Ｍ０３、ｌｏｔ＃１１２３８、０．５ｍｇ／ｍＬ）を捕捉抗体として使用した。カゼイン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ＃３７５２８）をブロッキング剤として使用し、１×ＰＢＳＴ（０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）を洗浄緩衝液として使用した。ストレプトアビジン－ＨＲ

Ｐ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ｃａｔ＃４３４３２３、Ｌｏｔ＃８１６７５５Ａ）を使用し、ＴＭＢ基質（Ｔｈｅｒｍｏ　＃３４０２１）を使用し、２Ｍ硫酸を停止溶液として、抗体結合を定量化した。

【０７８４】

プレートを１×ＰＢＳにおける０．６～２μｇ／ｍｌ　Ｍ０３抗体で一晩コーティングし、次にこれをカゼインと１時間インキュベーションしてブロッキングし、ＰＢＳＴで３回洗浄することにより、ＥＬＩＳＡアッセイを行った。次に、プレートを標準および試料と共に１時間インキュベートし、３回ＰＢＳＴで洗浄し、次にＰＢＳＴに希釈した５００ｎｇ／ｍｌのビオチン化Ｍ０１と共に１時間インキュベートし、３回ＰＢＳＴで洗浄し、２００ｎｇ／ｍｌのストレプトアビジン－ＨＲＰと共に１時間インキュベートし、３回ＰＢＳＴで洗浄し、次にＴＭＢ基質を４分間加えた。停止溶液により反応を停止し、４５０ｎｍにおける吸光度を読み取った。

【０７８５】

バックグラウンド減算をしていない平均未加工吸光度値に基づく検量線に基づき、結果を定量化した。検量線適合のためにＰｒｉｓｍを使用した。モデル：Ｌｏｇ（アゴニスト）ｖｓ．応答適合［４－パラメータロジスティック回帰分析］パーセント回復を、次式により個々の濃度ポイント毎に計算した（平均化せず）：

【数１】

$$\frac{(\text{測定値}-\text{実際値})\times 100\%}{(\text{実際値})}$$

【０７８６】

他の読み出し情報。ラットを毎日秤量した。循環酵素解析（Ｉｄｅｘｘ）に使用するために１、８、１２日目（尾静脈から）および１５日目（末端）に血清試料を採取し、商業的ＥＬＩＳＡキットを用いて血清中骨格筋トロポニン－Ｉ測定値を測定した。３、５、８、１０、１２および１５日目の投薬前に尿検査を行った。１５日目にラットを安楽死させる前に単離した血液においてＣＢＣ解析を行った。１５日目に、ラットを安楽死させ、大腿屈筋の筋肉および肺（膨張せず）の一部を、パラフィン包埋および切片のＨ＆Ｅ染色のために１０％ＮＢＦに置いた（Ｐｒｅｍｉｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）。大腿屈筋の筋肉および肺の別の一部を－８０Ｃに置き、ＲＮＡ抽出およびプロファイリングに使用した。肝臓、腎臓および心臓も１５日目に単離し、長期組織貯蔵のため、パラフィン包埋（ＴＳＲＩ　Ｈｉｓｔｏｌｏｇｙ）のために亜鉛－ホルマリンに置いた。

【０７８７】

結果。本試験において１００％が生存しており、全ラットが生存し、１５日目に解体（takedown）を予定した。スタチン投薬ラットは、スタチンを投薬しなかった対照ラットよりも低い平均体重を有した。１５日目に、スタチン＋ビヒクル群は、全群で最低の平均ラット体重を有し、一方、スタチン＋３ｍｇ／ｋｇ　ＨＲＳ（１～５０６）投薬群は、全スタチン処置動物で最高の体重平均を有した（データ図示せず）。ＣＢＣ解析は、異なる動物処置群間の変化の全体的に類似のパターンを示した（データ図示せず）。

【０７８８】

１２および１５日目に、スタチン処置ラットにおいて、未処置対照を上回る血清ＣＫの僅かな増加が観察された。１２日目に、１ｍｇ／ｋｇおよび３ｍｇ／ｋｇ　ＨＲＳ（１～５０６）を投薬したラットは、スタチン＋ビヒクル処置動物と比較してより小さくより緊密なＣＫ平均を有し（図１１）、これは、スタチン誘導性筋炎におけるＨＲＳ（１～５０６）処置のプラスの影響と一貫し、また、筋肉機能におけるＨＲＳ（１～５０６）のプラスの効果と一貫し、筋肉トロポニンＣレベルも、ＨＲＳ（１～５０６）処置動物において低下した（図１０Ｂ）。さらに、内在性血清ＨＲＳレベルは、スタチンを与えなかったラットと比較してスタチン処置ラットにおいて上昇し（図１２）、ＨＲＳの放出が、筋肉炎症の内在性調節因子としての役割を果たし得ることを示唆する。大腿屈筋におけるＨ＆Ｅ染色は、ビヒクル投薬および０．３ｍｇ／ｋｇ　ＨＲＳ（１～５０６）投薬ラットと比較

して、１ｍｇ／ｋｇおよび３ｍｇ／ｋｇ　ＨＲＳ（１～５０６）を投薬したスタチン処置ラットにおける筋肉変性／壊死および炎症スコアの低下を実証した（図１３）。

【０７８９】

スタチン誘導性ミオパチーにおけるＨＲＳの効果の機構的基盤をさらに精査するため、試験完了後に、処置動物由来の大腿屈筋における遺伝子発現の変化を調査した。上述の１５日目のラットから単離した大腿屈筋の筋肉においてＲＮＡプロファイリングを行った。これらの試験から得られた結果は、スタチン処置に応答して５倍を超えて上昇した全１３種の遺伝子が、ＨＲＳ（１～５０６）処置により低下したことを実証した（表Ｅ１１；および図１４～図１５を参照）。

【表Ｅ１１】

表E11

25倍よりも高く調節された遺伝子	10倍よりも高く調節された遺伝子	4倍よりも高く調節された遺伝子	変化なし
CD8a	MCP1	CD11a	HARS
MMP9	CD8b	CD11b	HARS2
IL6	CCR5	CD45	DARS
IL10	CD18	SDC1	GARS
		IFN-g	QARS

【０７９０】

スタチン処置ラット大腿屈筋の転写プロファイリングは、１０種の糖尿病／メタボリックシンドローム関連遺伝子（図１６）および数種のハウスキーピング遺伝子（データ図示せず）が、ＨＲＳ処置により有意に影響されなかったことを明らかにした。対照的に、２６種の免疫細胞マーカー遺伝子のスタチン処置ラット大腿屈筋の転写プロファイリングは、ＩＴＧＡＬ（ＣＤ１１ａ）、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ８ａ、ＣＤ８ｂ、ＣＤ１８、ＣＣＲ５およびＰＴＰＰＣ（ＣＤ４５Ｒ）発現の用量依存的阻害を含む、多数の遺伝子（図１７～図１９を参照）の有意な変化を明らかにした。その上、ＨＲＳ（１～５０６）は、ＩＬ６、ＭＣＰ１、ＩＬ１０およびＩＦＮ－ガンマを含む多くの炎症マーカー遺伝子の発現低下において有効であった（図２０～図２１を参照）。１４種の接着、発生および線維症関連遺伝子（図２２～図２３を参照）、筋肉収縮性遺伝子Ｎｅｂ（データ図示せず）ならびに筋肉消耗、萎縮症および筋形成に関連する遺伝子（図２４～図２５を参照）における転写変化も観察された。

【０７９１】

結論。ビヒクルまたは低用量０．３ｍｇ／ｋｇ　ＨＲＳ（１～５０６）のいずれかを与えた動物と対照的に、１．０ｍｇ／ｋｇまたは３．０ｍｇ／ｋｇのいずれかのより高用量のＨＲＳ（１～５０６）を与えた動物において、ＣＫ、血清トロポニン－Ｉおよび筋肉細胞変性／壊死および筋肉炎症の減少が全て観察された。ＲＮＡプロファイリングデータは、より高用量のＨＲＳ（１～５０６）を投薬したスタチン処置ラットの大腿屈筋におけるＣＤ８ａ、ＩＬ－６、ＭＣＰ－１およびｍＭＰ－９発現の低下を実証することにより、これらの結果を支持した。これらの遺伝子の上方調節は、損傷筋組織への増加した免疫細胞浸潤による可能性が最も高い。発現遺伝子の同一性に基づき、浸潤している免疫細胞は、次の細胞型、Ｔ細胞、樹状細胞、ＮＫ細胞およびマクロファージ／単球のうち１種または複数で構成されている可能性が高い。これらの細胞型は全て、筋肉炎症に関連付けられており、この免疫細胞流入の劇的な阻害を媒介するＨＲＳ（１～５０６）を含むＨＲＳポリペプチドの能力は、ＨＲＳ（１～５０６）等、ＨＲＳポリペプチドが、幅広い範囲の炎症性および自己免疫疾患および障害において強力な免疫調節物質として作用することができる強力な免疫調節性を表すことを示唆する。

【０７９２】

（実施例１１）

筋ジストロフィーの処置のためのＨＲＳポリペプチドの評価

【０７９３】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）は、ジストロフィン関連糖タンパク質複合体（ＤＧＣ）内で機能する筋細胞膜下タンパク質であるジストロフィンをコードする遺伝子における変異に起因する。この複合体は、細胞内細胞骨格を細胞外マトリックスに接続する。ＤＧＣは、サルコメアのＺ線に濃縮され、筋線維に及ぶ力を伝達させる。この連結の破壊は、筋鞘破裂を最終的に生じる膜不安定性を生じる。細胞外カルシウムの流入は、筋収縮等の分子過程を変更し、タンパク質分解活性を活性化する。罹患した筋線維は、壊死性またはアポトーシス性となり、炎症過程を惹起する分裂促進的化学誘引物質を放出する。変性および再生のサイクルは、最終的に、不可逆的筋肉消耗ならびに線維性および脂肪性組織による交換を生じる。

【０７９４】

筋肉は、正常には静止状態であり、基底膜および筋線維の間に位置する未分化筋原性前駆細胞（サテライト細胞）の活性化により再生する可能性がある。活性化により、サテライト細胞は、非対称的に増殖および分裂し、娘細胞は、多岐にわたる細胞運命を有する。娘細胞のうちただ１個が分化し、筋芽細胞スタジアム（stadium）へと進行し、その後、他の筋芽細胞または損傷した筋線維と融合して、筋線維修復を誘導する。他の娘細胞は、増殖的な状況を維持するまたは静止状態に戻る。ＤＭＤの原因である遺伝的変異は、サテライト細胞にも存在する。したがって、正常な筋肉機能を回復させる能力は、依然として妨害されている。少数の筋線維は、主に筋原性前駆細胞における読み枠を回復する二次変異により、機能的ジストロフィンを産生することができる。しかし、このようないわゆる復帰変異体線維は、ジストロフィン欠損の病理学を軽減するには数が少な過ぎる。変性および再生サイクルによるサテライト細胞プールの消尽は、疾患に決定的に寄与すると考えられる。

【０７９５】

ＤＭＤのｍｄｘマウスモデルは、中途終止コドンを導入するＤｍｄ遺伝子のエクソン２３に自発的変異を有する。ｍｄｘマウスの病理学は、ヒト病理学と類似性を有する組織学的に十分に定義されたステージによって特徴付けられる。新生児筋組織は、罹患していないと考えられる。炎症と組み合わされた壊死性またはアポトーシス性過程は、生後およそ３週目に出現する。再生過程は、生後６週目前後に開始し、１２週目まで進行中の変性と交互に現れつつ継続する。Ｍｄｘマウスはその後（＞６５週間）、壊死性過程を持続しつつ、その再生能力における減退を示す。変性過程は、ヒト病理学に観察される過程と類似しているため、再生における差は、妥当な筋肉機能の回復の手がかりの１つを握っている可能性がある。

【０７９６】

したがって、このマウスモデルは、ヒト疾患と直接的な関連性のある遺伝的背景および筋ジストロフィーの処置における筋肉細胞変性、再生および炎症におけるＨＲＳポリペプチドの影響を検査するためのｉｎ　ｖｉｖｏモデル系を提供する。

【０７９７】

本試験の目的は、ＨＲＳ（１～５０６）による処置に応答した循環酵素レベルの変更ならびに筋肉機能および炎症マーカーの遺伝子発現の変化によって示される、ｍｄｘマウスモデルの筋肉機能の進行性損失における、ジストロフィン遺伝子の遺伝的欠損の加齢関連の効果の逆転におけるＨＲＳ（１～５０６）の効力を評価することであった。

【０７９８】

これを達成するため、８匹の動物（Ｃ５７Ｂ：／１０ＳｃＳｎ－Ｄｍｄ^{mdx}／Ｊマウス；試験開始時に６週齢）の群に、ＩＶ注射によりビヒクル、ＨＲＳ（１～５０６）（３ｍｇ／Ｋｇ）または陽性対照（デキサメタゾン）（１ｍｇ／Ｋｇ）を１日１回、１４日間投与した。

【０７９９】

プロトコールおよび方法。試験１、８および１５日目にマウスを秤量した。ワイヤー吊り（wire　hang）筋肉機能検査を行って、１、８および１５日目に筋力を評定した。循環酵素解析（Ｉｄｅｘｘ）に使用するために、１、８日目（尾静脈により）および１５日目

（末端）に血清試料を採取した。１５日目にラットを安楽死させる前に単離した血液においてＣＢＣ解析を行った。１５日目にラットを安楽死させ、前脛骨筋および横隔膜の一部を、パラフィン包埋および切片のＨ＆Ｅ染色のために１０％ＮＢＦに置いた（Ｐｒｅｍｉｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）。

【０８００】

結果：試験８または１５日目のいずれかにおいて、未処置対照と比較して、ＨＲＳ（１～５０６）またはデキサメタゾン（ＤＥＸ）で処置した動物の体重、吊り時間またはＣＢＣデータに有意差は観察されなかった（データ図示せず）。しかし、ビヒクル対照と比較して、ＨＲＳ（１～５０６）およびデキサメタゾンにより処置したマウスにおいて、血清ＣＫ、ＡＳＴおよびＬＤＨの低下が観察された（図２６）。

【０８０１】

結果は、僅か１４日間の投薬により、ＣＫ、ＡＳＴおよびＬＤＨレベルを含む、筋肉炎症の種々の血清マーカーの循環レベルの一貫した低下が観察されたことを実証し、ＨＲＳ（１～５０６）が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）のｍｄｘマウスモデルにおいて治療効力を有することを示した。

【０８０２】

（実施例１２）

肢帯型筋ジストロフィーの発症における、ＨＲＳに対する抗体の影響の評価

【０８０３】

肢帯型筋ジストロフィー２Ｂ型（ＬＧＭＤ２Ｂ）は、ジスフェリン遺伝子中の機能喪失型変異によって引き起こされる。ジスフェリンは、骨格および心筋において主に発現されるが、単球、マクロファージおよび他の組織においても発現され、そこで細胞質小胞および細胞膜に局在化される。ジスフェリンは、膜融合および輸送と共に修復過程に関与すると考えられる。ＬＧＭＤ２Ｂは、進行性対称的筋衰弱および著しく侵襲性な免疫／炎症病理学により特徴付けられる遅発性（十代／若年成人）の筋肉疾患である。筋肉生検は、典型的に、主にマクロファージ／マクロファージ活性化マーカー（ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＡＢＣ、ＣＤ８６）、ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞およびＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞からなる顕著な炎症性細胞浸潤と共に、筋肉繊維変性／再生を示す。

【０８０４】

ＳＪＬ／Ｊマウスは、ジスフェリンのエクソン４５の３’スプライスジャンクションに１７１ｂｐのインフレーム欠失を有する。このマウスは、加齢するにつれて、明確な筋肉炎症を伴う自発性ミオパチーを発症する。まとめると、これらの特色は、ＳＪＬ／Ｊマウスを、ヒトジスフェリン欠損ミオパチーの遺伝的ホモログとする。ＳＪＬ／Ｊマウス筋肉における炎症性の変化は、典型的に、生後４～６週間前後に始まり、活性化マクロファージ、続いてＣＤ４＋Ｔ細胞の浸潤により特徴付けられる。６ヶ月目に、浸潤は、一部の筋肉繊維壊死と共に、主にマクロファージからなる。１６ヶ月目までに、筋肉繊維は、完全に変性し、脂肪およびコラーゲンに交換される。

【０８０５】

ＳＪＬ／Ｊ系統の生化学的および組織学的特色は、相対的に十分に実証されているが、進行中のミオパチーの機能的な原因は、特に、潜在的処置戦略の評価に有用となる可能性が高い疾患の初期段階において、完全に特徴付けられていない。ＳＪＬ／Ｊ系統において働いている炎症過程の調節における内在性ＨＲＳポリペプチドの潜在的な役割を直接的に評価するため、マウスを全長ＨＲＳで免疫化して、いかなる内在性ＨＲＳも隔離した。ＨＲＳが、筋肉における炎症過程の調節に関与する場合、このアプローチは、筋肉炎症の誘導をもたらすはずである。したがって、このマウスモデルは、ヒト疾患に直接的な関連性を有する遺伝的背景における筋肉細胞変性、再生および炎症のモジュレートならびに筋ジストロフィーの処置におけるＨＲＳポリペプチドの役割に追加的な支持を提供する。

【０８０６】

全長ＨＡＲＳに対する抗体を作製するため、皮下免疫化により、１日目に完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）と共にＳＪＬ／Ｊマウスを免疫化し、１５および２９日目にＩ

ＦＡと抗原のブーストを与えて、抗体産生をさらに刺激した。
【０８０７】
プロトコールおよび方法。１、１５および２９日目に、８匹の動物、ＳＬＪ／Ｊ雄マウス（ＪＡＸ　ｌａｂｓ）；（試験開始時に８週齢）の群を、皮下投与により完全フロイントアジュバントと共に０．２ｍｇの全長マウスＨＲＳ（ｍＨＲＳ）で免疫化した。１０、２５および４３日目に血清を単離して、抗体産生を決定した。４３日目にマウスを屠殺し、組織学検査（切片のＨ＆Ｅ染色（Ｐｒｅｍｉｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ））のために大腿屈筋および肺（肺は膨張）の両方を収集した。４３日目に単離した血清における循環酵素レベルを調査した（Ｉｄｅｘｘ）。
【０８０８】
結果：ｍＨｉｓＲＳで皮下免疫化したＳＪＬ／Ｊマウスは、全長ＨｉｓＲＳに対する頑強な抗体応答を生じた（図２７Ａ）。ビヒクル対照と比較して免疫化マウスにおいて、循環酵素レベルの有意な変化は観察されなかったが、ａＣＫレベルは、ＨＲＳ免疫化群において僅かに上昇した（データ図示せず）。しかし、ＨｉｓＲＳ免疫化マウス由来の筋組織は、細胞浸潤および筋炎の一部の領域を明らかに示し（図２７Ｂ）、この病理組織学検査と一貫して、２匹の免疫化マウスは、筋炎の徴候を表示した。
【０８０９】
（実施例１３）
ＨＲＳポリペプチドの安定化製剤の開発
【０８１０】
ＨＲＳポリペプチドの貯蔵に最適な緩衝液条件を決定するため、段階的アプローチを使用して、基礎的製剤条件を最適化した。これらの試験は、タンパク質安定性および溶解性を維持するために最適なｐＨ範囲、好ましい安定化緩衝剤および賦形剤（複数可）の決定に関与した。
【０８１１】
２ｍｇ／ｍｌの濃度となるよう「対照緩衝液」（２０ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）において貯蔵したタンパク質により試験を行った。ストックタンパク質濃度（１２．５ｍｇ／ｍｌ、－８０℃で貯蔵）を、２ｍｇ／ｍｌの濃度までそれぞれの緩衝液において最終容量９．１ｍｌとなるよう希釈することにより、ＨＲＳ（１～５０６）の作業用ストック溶液を調製した。次に、１０ｋＤａ　ＭＷＣＯ　Ｓｌｉｄｅ－Ａ－Ｌｙｚｅｒｓ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を用いて、２Ｌの所望の緩衝液に対して希釈タンパク質を一晩２～８℃で透析し（Ｐ／Ｎ：６６８１０）、次に翌日、２Ｌの新鮮緩衝液において４時間透析した。
【０８１２】
透析後に、試料を検査して測定パラメータのゼロ時の値を決定し、５ｍｌポリスチレンチューブ（ＢＤ　Ｆａｌｃｏｎ、＃３５２８５９）内に１ｍｌ／条件の容量で分配した。チューブの蓋を閉め、蓋をパラフィルムでラップした。透析前後に視覚的検査を行った。各試料に対し行ったアッセイは、外観、ｐＨ、示差走査蛍光定量、濁度および不透明度、分子ふるいＨＰＬＣ解析（ＳＥ－ＨＰＬＣ）およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析を含んだ。分析方法：
【０８１３】
外観：２種のカテゴリー：Ａ）不透明度およびＢ）粒子における視覚的調査により、タンパク質の外観を評価した。カテゴリーＡ：１＝清澄；２＝僅かに不透明；３＝不透明；カテゴリーＢ：１＝粒子なし；２＝粒子が存在；３＝繊維（複数可）。結果は、「カテゴリーＡ、続いてカテゴリーＢ」のように表す。例えば、「１、１」の結果は、清澄溶液、粒子なしを意味する。
【０８１４】
ｐＨ：マイクロプローブ（Ａｃｃｕｍｅｔ　ｅｌｅｃｔｒｏｄｅ、ｃａｔ＃１３－６２０－２９２）を備えるＡｃｃｕｍｅｔ　Ｂａｓｉｃ　ＡＢ１５プラスｐＨメーター（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、試料ｐＨを測定した。メーカーの説明マ

ニュアルに従って較正および測定を行った。

【０８１５】

吸光度：ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍ２分光光度計（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を使用して、２８０ｎｍ、３４０ｎｍおよび５８０ｎｍにおける吸光度を測定した。各時点において、１００μＬの非処理（未加工（neat））試料を、Ａ３４０（濁度）およびＡ５８０（不透明度）読み取りに使用した。残りの試料を５分間１４，０００ｒｃｆでスピンし、上清を相当する緩衝液において４倍希釈し、Ａ２８０吸収を測定した。

【０８１６】

熱変性における親油性色素の蛍光強度の関数として蛍光をモニタリングすることにより、タンパク質試料において示差走査蛍光定量（ＤＳＦ）を行った。１００μＬ最終容量のＰＢＳ、ｐＨ７．０（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭリン酸塩）において０．５ｍｇ／ｍＬに希釈し、超高純度蒸留水（Ｇｉｂｃｏ、Ｐ／Ｎ　１０９７７）におけるストック溶液（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｐ／Ｎ　４４６１１４６）の２０倍希釈により調製した熱シフト色素溶液と混合した後の試料において試験を行った。５μＬの希釈色素を、１００μＬの試料に加えた。３８４ウェルクリアオプティカル反応プレート（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ／　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｐ／Ｎ　４３０９８４９）に、各ウェル２０μＬで試料当たり４ウェル複製して、混合物を蒔いた。ＶｉｉＡ　７リアルタイムＰＣＲ機器（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ／Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｐ／Ｎ　４４５３５５２）によりプレートを読み取った。熱変性プロトコールは、１．６℃／秒の変化速度で始まり、２５℃の温度に到達するまでこれを続け、到達したら機器はこの温度を２分間保持し、その後、０．５℃／秒の速度で温度を９９℃までさらに増加させ、到達したらこの温度をさらに２分間保持した。

【０８１７】

ＴＳＫｇｅｌ　Ｓｕｐｅｒ　ＳＷ３０００、４．６ｍｍ　ＩＤ×３０ｃｍ、４μｍ粒子サイズ、２５０Åカラム（Ｔｏｓｏｈ、１８６７５）を使用し、２００ｍＭリン酸Ｎａ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０の移動相を使用して０．３ｍｌ／分の流速で、真空脱気装置、２つ組／４つ組ポンプ、サーモスタット式オートサンプラー、サーモスタット式カラム区画、ダイオードアレイ検出器（ＤＡＤ）およびＣｈｅｍｓｔａｔｉｏｎクロマトグラフィーソフトウェア）を備えるＡｇｉｌｅｎｔ　１２６０　ＨＰＬＣシステムにより、精製タンパク質試料において分子ふるいＨＰＬＣ（ＳＥ－ＨＰＬＣ）解析を完了した。短い遠心分離の後に、各タンパク質の未希釈試料（４０μｇ）を注射した。システム適合性試料（ウシ血清アルブミン、ＢＳＡ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｐ／Ｎ：２３２０９）および内部対照（野生型ＨＲＳ）を、検査の妥当性を確保するためのブラケット試料に使用した。

【０８１８】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ解析：断片化および凝集を評定するため、時点毎に還元および非還元ＳＤＳゲルを泳動した。４～１２％ビス－Ｔｒｉｓ　ＮｕＰＡＧＥプレキャストゲル、１．５ｍｍ×１０ウェル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＰＮ　ＮＰ０３３５ＢＯＸ）およびＮｕＰＡＧＥ　ＭＥＳ　ＳＤＳランニング緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＰＮ　ＮＰ０００２）またはＮｕＰＡＧＥ　ＭＯＰＳ　ＳＤＳランニング緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＰＮ　ＮＰ００１）を使用したＸＣｅｌｌ　Ｓｕｒｅｌｏｃｋ　Ｍｉｎｉ－Ｃｅｌｌシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、メーカーの説明書に従って、レーン毎に各タンパク質の１０μｇ試料をローディングし、解析した。４×ストック（０．２５Ｍ　Ｔｒｉｓ、８％ＳＤＳ、４０％グリセロール、０．００８％ブロモフェノールブルー、２０％１４．３Ｍ　βＭＥ）から還元用試料緩衝液を調製した。メルカプトエタノール抜きで非還元用試料緩衝液を調製した。着色分子量マーカーは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（ＢｌｕｅＰｌｕｓ２、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＰＮ　ＬＣ５９２５を参照）から得た。ゲルをメーカーの説明書に従ってＩｎｓｔａｎｔＢｌｕｅ（Ｅｘｐｅｄｅｏｎ　ＰＮ　ＩＳＢ１Ｌ）で染色した。

【０８１９】

熱安定性におけるｐＨおよびヒスチジンの効果に関する予備試験。６×Ｈｉｓタグ付き全長ＨＡＲＳおよび６×Ｈｉｓタグ付きＨＲＳ（１～５０６）を使用して、探索的安定性試験を行った。それぞれのｐＨにおける緩衝液への一晩透析により、表示のｐＨ（ｐＨ５．５、６．０、６．５、７．０または７．５）の２０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液において、全長タンパク質を透析した。ＤＳＦ解析の結果は、ｐＨ７～７．５でインキュベートした場合、ＨＲＳに２種の熱転移が存在することを実証した。第１の転移は、図２８Ａにおける矢印で示す通り４８℃で起き、このｐＨ範囲における主要転移は、５４℃前後で起きた。ｐＨインキュベーション条件毎の主要転移温度を、表Ｅ１２にまとめる。ＳＥ－ＨＰＬＣ解析は、ｐＨ６．５～７．５で貯蔵した試料の匹敵するレベルの高分子量（ＨＭＷ）ピークと、ｐＨ５．５前後で貯蔵した試料による有意により高いＨＭＷ含量を明らかにした（データ図示せず）。ｐＨ５．５緩衝液で貯蔵した試料による沈殿も観察され、この試料のさらなる評価は行わなかった。

【表Ｅ１２】

表 E12
全長HARSの主要熱転移温度

pH	Tm
7.5	54.2
7.0	54.2
6.5	52.9
6.0	47.7
5.5	n.d

【０８２０】

したがって、これらの予備試験から得られた結果は、最適ｐＨが、約６．５～ｐＨ７．５の範囲内であることを示唆し、下により詳細に概要を述べる通り、このｐＨ範囲内でさらにより詳細な試験を行った。

【０８２１】

外来性ヒスチジンの添加がＨＡＲＳの安定性に影響し得るか決定するため、０．１～５０ｍＭの範囲内のヒスチジン濃度の範囲にわたって予備安定性試験を行った。０．５～１０ｍＭヒスチジン範囲内の実験の結果を図２８Ｂに示し、より広い範囲の濃度の効果を表Ｅ１３に示す。

【０８２２】

【表Ｅ１３】

表E13 HRS(1～506)の熱安定性に対するヒスチジンの影響	
Hisの濃度 (mM)	**T_m**
低範囲 (0.01 ～0.5 mM)	
0	48.03
0.01	48.03
0.03	48.21
0.05	48.38
0.08	49.08
0.1	49.08
0.2	49.96
0.3	50.31
0.4	50.83
0.5	51
高範囲 (0.5～ 50 mM)	
0	48.03
0.5	52.23
1	53.81
2	54.68
3	55.73
5	56.26
10	57.49
50	56.94

【０８２３】

これらの実験から得られた結果は、外来性ヒスチジンの添加が、ＨＲＳポリペプチドの構造の安定化において幅広い濃度範囲にわたって有効であることを実証する。この効果は、０．０３ｍＭもの低さのヒスチジン濃度において明らかであり、５ｍＭ前後以上の濃度においてその最大に達し始める。したがって、約０．０３ｍＭ～５０ｍＭの範囲内のヒスチジン濃度は、ＨＲＳポリペプチドの安定化において有効であり、約２ｍＭ～約５０ｍＭの範囲内のヒスチジン濃度は、ＨＲＳポリペプチドの有意に改善された熱安定化をもたらす。

【０８２４】

ＨＲＳポリペプチド安定性におけるｐＨの影響の詳細な特徴付け。より幅広い範囲のインキュベーション条件にわたり、ｐＨ６．０～７．５の範囲内のより詳細な分析特徴付けにより、ＨＲＳ（１～５０６）の安定性におけるｐＨの影響を評価した。上述の分析方法を使用して、５Ｃ、室温および３７℃で最大１週間インキュベートした試料により、これらの試験を行った。これらの試験から得られた結果を表Ｅ１４にまとめる。

【０８２５】

【表Ｅ１４－１】

表E14 最適pHの評価								
		吸光度			濃度	SE-HPLC		
緩衝液条件	外観	A340	A580	A280	(mg/ml)	%HMW	主要%	%LMW
20 mM リン酸 Na , 150 mM NaCl, pH 7.0								
Tゼロ	1,1	0	-0.001	0.338	2.1	0.3	97.0	2.7
3 時間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7日間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 時間 RT		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 RT		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7日間 RT		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 時間 37C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
3日間37C		++	ND	ND	ND	0	ND	ND
50 mMリン酸 Na , pH 7.5								
Tゼロ	1,1	0	-0.008	0.313	2.0	0.3	96.9	2.8
3 時間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
7日間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 時間 RT		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 RT		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
7日間 RT		+	ND	ND	ND	0	ND	ND

【表Ｅ１４－２】

3時間 37C		0	ND	ND	ND	++	ND	ND
3日間 37C		++++	ND	ND	ND	0	ND	ND
50 mM リン酸 Na , pH 7.0								
Tゼロ	1,1	+	0.069	0.343	2.2	0.7	96.3	3.0
3 時間 5 C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 5 C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
7日間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3時間 RT		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 RT		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7日間 RT		+	ND	ND	ND	+	ND	ND
3 時間 37C		+	ND	ND	ND	+	ND	ND
3時間 37C		+++	ND	ND	ND	++	ND	ND
50 mM リン酸 Na, pH 6.5								
Tゼロ	1,3	0	0.000	0.320	2.0	0.6	96.4	3.0
3 時間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 5 C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
7日間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3時間 RT		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 RT		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7日間 RT		++	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 時間 37C		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 37C		+++	ND	ND	ND	++++	ND	ND
50 mM リン酸 Na , pH 6.0								
Tゼロ	1,1	0	0.006	0.327	2.1	0.4	96.4	3.1
3時間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 5 C		0	ND	ND	ND	+	ND	ND
7日間 5 C		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3時間 RT		0	ND	ND	ND	0	ND	ND
3日間 RT		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
7日間 RT		+	ND	ND	ND	0	ND	ND
3 時間 37C		++	ND	ND	ND	+	ND	ND
3日間 37C		+++++	ND	ND	ND	+++++	ND	ND
A340に関し: “+++++” =A340 > 2.0; “++++” =A340 >1.5, 但し<2.0; “+++” =A340>1.0, 但し<1.5; “++” =A340>0.5, 但し<1.0; “+” =A340>0.05, 但し<0.5;および“0” = A340<0.05								
% HMWに関し: “+++++” = %HMW > 5.0; “++++” = %HMW >4.0, 但し<5.0; “+++”= %HMW >3.0, 但し <4.0; “++” %HMW >2.0, 但し<3.0; “+” = %HMW >1.0, 但し<2.0;および “0” = %HMW <1.0								

【０８２６】

結果は全体として、タンパク質が、約ｐＨ７．０～約ｐＨ７．５の範囲内のｐＨの緩衝液においてインキュベートした場合、相対的に安定的であるが、より低いｐＨにおいて潜在的な分解および凝集問題が現れ始めることを示唆する。検査した条件および得られたアッセイ結果に基づき、ＨＲＳポリペプチドの貯蔵に最適なｐＨ範囲が、約ｐＨ７．０～約７．５の範囲内であることが結論付けられる。

【０８２７】

ＨＲＳポリペプチド安定性における異なる緩衝液組成の影響の詳細な特徴付け。３種のｐＨ値、７．３、７．０および６．５におけるリン酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤およびヒスチジン緩衝剤に基づく３種の代替緩衝液系を使用して、ＨＲＳ（１～５０６）の安定性における緩衝液組成の影響を評価した。上述の分析方法を使用して、５℃、室温および３７℃で最大１週間インキュベートした試料によりこれらの試験を行い、結果を表Ｅ１５にまとめる。

【０８２８】

【表Ｅ１５－１】

表 E15 最適緩衝液の評価								
		吸光度			濃度	SE-HPLC		
緩衝液条件	外観	A340	A580	A280	(mg/ml)	%HMW	%主要	%LMW
50mM リン酸 Na、pH7.3								
T ゼロ	1,1	0	-0.008	0.292	1.8	0.3	96.4	3.3
2 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**
2 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 37C		+++	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
50mM リン酸 Na、pH7.0								
T ゼロ	1,1		0.009	0.001	0.291	1.8	0.3	96.4
2 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 37C		++	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
50mM リン酸 Na、pH6.5								
T ゼロ		0.009	0.001	0.290	1.8	0.5	96.0	3.5
2 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**
3 時間 37C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 37C		++	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
50mM クエン酸塩、pH7.3								
T ゼロ	1,1		-0.011	0.287	1.8		96.4	3.2
2 日間 5 C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5 C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 37C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
50mM クエン酸塩、pH7.0								
T ゼロ		-0.001	-0.008	0.294	1.8	0.2	96.6	3.2
2 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5 C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 37C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**

【表Ｅ１５－２】

50mM クエン酸塩、pH6.5								
T ゼロ		-0.001	-0.010	0.287	1.8	0.3	96.6	3.1
2 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5 C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 37C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
50mM L-ヒスチジン、pH7.3								
T ゼロ		-0.008	-0.016	0.242	1.5	0.4	96.1	3.5
2 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5 C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**
50mM L-ヒスチジン、pH7.0								
T ゼロ		-0.003	-0.014	0.253	1.6	0.4	96.3	3.3
2 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**
50mM L-ヒスチジン、pH6.5								
T ゼロ		0.327	0.080	0.269	1.7	0.4	96.4	3.2
2 日間 5C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
7 日間 5C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 RT		++	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**
7 日間 RT		++	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**
3 時間 37C		++++	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**
2 日間 37C		+++++	**ND**	**ND**	**ND**	++	**ND**	**ND**
A340 に関し:「+++++」=A340>2.0;「++++」=A340>1.5、但し<2.0;「+++」=A340>1.0、但し<1.5;「++」=A340>0.5、但し<1.0;「+」=A340>0.05、但し<0.5;および「0」=A340<0.05								
%HMW に関し:「+++++」=%HMW>5.0;「++++」=%HMW>4.0、但し<5.0;「+++」=%HMW>3.0、但し<4.0;「++」%HMW>2.0、但し<3.0;「+」=%HMW>1.0、但し<2.0;および「0」=%HMW<1.0								

【０８２９】

結果および結論：約ｐＨ７．０～ｐＨ７．４の範囲内のヒスチジン緩衝剤は、これらの試験において最良の性能を有していた。ヒスチジン緩衝剤も、ＨＲＳポリペプチドフォールド安定性をほぼ８℃改善した（データ図示せず）。ＨＲＳポリペプチドは、幅広い範囲内のｐＨ値（ｐＨ６．７～７．３）のクエン酸緩衝剤においても優れた安定性を表示した。

【０８３０】

ヒスチジン緩衝剤と比較してクエン酸緩衝剤に観察されたより大きい範囲の許容されるｐＨは、ヒスチジンおよびクエン酸塩ベースの緩衝剤の両方が、ＨＲＳポリペプチドの貯

蔵緩衝剤としてさらに評価するために潜在的に魅力のある候補緩衝剤系であることを示唆する。

【０８３１】

ＨＲＳポリペプチド安定性における異なる賦形剤の影響の詳細な特徴付け。スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、アルギニン、グリシン、グリセロールおよび高塩（２８０ｍＭ　ＮａＣｌ）を含む種々の潜在的賦形剤を使用して、ＨＲＳ（１～５０６）の安定性における緩衝液組成の影響を評価した。上述の分析方法を使用して、５℃、室温および３７℃で最大１週間インキュベートした試料によりこれらの試験を行い、結果を表Ｅ１６および表Ｅ１７にまとめる。

【０８３２】

【表Ｅ１６－１】

表 E16
最適賦形剤の評価

		吸光度			濃度	SE-HPLC			
緩衝液条件	外観	A340	A580	A280	(mg/ml)	%HMW	%主要	%LMW	Tm
50mM L-ヒスチジン、pH7.3									
T ゼロ	1,1	0.024	0.010	0.300	1.9	0.8	97.2	2.0	56.94
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**++**	**ND**	**ND**	
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	++	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM スクロース、pH7.3									
T ゼロ	1,1	0.005	-0.008	0.318	2.0	0.7	97.3	2.0	57.64
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**+**	**ND**	**ND**	
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	++	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM マンニトール、pH7.3									
T ゼロ		0.017	0.001	0.321	2.0	0.8	97.4	1.7	57.46
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		+	**ND**	**ND**	**ND**	0	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	0	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		+	**ND**	**ND**	**ND**	**+**	**ND**	**ND**	
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	0	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM トレハロース、pH7.3									
T ゼロ	1,1	0.013	0.000	0.342	2.2	0.8	97.5	1.7	57.64
3 日間		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	

【表Ｅ１６－２】

5C									
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM ソルビトール、pH7.3									
T ゼロ		-0.035	-0.051	0.263	1.7	0.8	97.4	1.8	57.64
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM アルギニン、pH7.3									
T ゼロ		0.007	0.001	0.344	2.2	0.7	97.3	1.9	58.34
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM グリシン、pH7.3									
T ゼロ		0.037	0.022	0.333	2.1	0.8	97.3	1.8	57.29
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		+	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**+**	**ND**	**ND**	
3 時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	

【表Ｅ１６－３】

3日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM グリセロール、pH7.3									
Tゼロ		0.033	0.017	0.284	1.8	0.9	97.3	1.8	57.29
3日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+++	**ND**	**ND**	
3時間 37C		+	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3日間 37C		+++	**ND**	**ND**	**ND**	+++++	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM NaCl pH7.3									
Tゼロ		0.060	0.046	0.353	2.2	0.7	97.5	1.9	59.74
3日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3時間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
A340に関し:「+++++」=A340>2.0;「++++」=A340>1.5、但し<2.0;「+++」=A340>1.0、但し<1.5;「++」=A340>0.5、但し<1.0;「+」=A340>0.05、但し<0.5;および「0」=A340<0.05 %HMWに関し:「+++++」=%HMW>5.0;「++++」=%HMW>4.0、但し<5.0;「+++」=%HMW>3.0、但し<4.0;「++」%HMW>2.0、但し<3.0;「+」=%HMW>1.0、但し<2.0;および「0」=%HMW<1.0									

【０８３３】

これらの結果は、ヒスチジン緩衝剤の存在下における、ｐＨ７．０～ｐＨ７．５の範囲内の、塩化ナトリウム、アルギニン、スクロース、トレハロース、ソルビトールおよび／またはグリシンの存在下における、ＨＲＳポリペプチドの安定性における有意な改善を実証する。追加的な安定化特徴を備える製剤を開発する可能性をさらに評価するため、表Ｅ１７に収載されている組合せを評価した。

【０８３４】

【表Ｅ１７－１】

表 E17
さらに最適な賦形剤の評価

		吸光度			濃度		SE-HPLC		
緩衝液条件	外観	A340	A580	A280	(mg/ml)	%HMW	%主要	%LMW	Tm
50mM L-ヒスチジン+280mM スクロース+0.05% PS80、pH7.3									
T ゼロ	1,1	0.020	0.004	0.380	2.4	1.3	97.0	1.7	58.35
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	+++++	**ND**	**ND**	
7 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	+++++	**ND**	**ND**	
5×凍結融解		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM アルギニン+0.05% PS80、pH7.3									
T ゼロ	1,1	0.010	0.001	0.361	2.3	1.1	97.2	1.7	56.08
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	0	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	++	**ND**	**ND**	
7 日間 37 C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	++++	**ND**	**ND**	
5×凍結融解		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+280mM NaCl+0.05% PS80、pH7.3									
T ゼロ		0.012	0.002	0.372	2.3	1.3	97.0	1.7	62.03
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 37 C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	

【表Ｅ１７－２】

5×凍結融解		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+140mM NaCl+0.05% PS80、pH7.3									
T ゼロ	1,1	0.015	0.005	0.376	2.4	1.2	97.1	1.7	61.15
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	++	**ND**	**ND**	
5×凍結融解		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+140mM NaCl+2%トレハロース+0.05% PS80、pH7.3									
T ゼロ		0.009	-0.001	0.357	2.2	1.2	97.1	1.8	61.15
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 37 C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
5×凍結融解		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+140mM NaCl+2%スクロース+0.05% PS80、pH7.3									
T ゼロ		0.005	-0.004	0.366	2.3	1.1	97.2	1.8	61.15
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**+**	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	
7 日間 37 C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	+++++	**ND**	**ND**	
5×凍結		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	+	**ND**	**ND**	

【表Ｅ１７－３】

融解									
50mM L-ヒスチジン+140mM NaCl+2%スクロース+0.05% PS20、pH7.3									
T ゼロ		0.007	-0.001	0.385	2.4	0.1	97.9	1.9	60.98
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	**+**	**ND**	**ND**	
7 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	**+**	**ND**	**ND**	
5×凍結融解		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
50mM L-ヒスチジン+140mM NaCl+2%スクロース+0.1%プルロニック F68、pH7.3									
T ゼロ		0.015	0.008	0.352	2.2	0.2	97.9	1.9	60.10
3 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 5C		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 時間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 RT		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
3 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
7 日間 37C		**+**	**ND**	**ND**	**ND**	**+**	**ND**	**ND**	
5×凍結融解		**0**	**ND**	**ND**	**ND**	**0**	**ND**	**ND**	
A340 に関し:「+++++」=A340>2.0;「++++」=A340>1.5、但し<2.0;「+++」=A340>1.0、但し<1.5;「++」=A340>0.5、但し<1.0;「+」=A340>0.05、但し<0.5;および「0」=A340<0.05 %HMW に関し:「+++++」=%HMW>5.0;「++++」=%HMW>4.0、但し<5.0;「+++」=%HMW>3.0、但し<4.0;「++」%HMW>2.0、但し<3.0;「+」=%HMW>1.0、但し<2.0;および「0」=%HMW<1.0									

【０８３５】

結果：これらの緩衝液系を使用すると、試料を５℃または室温でインキュベートした場合、濁度またはＨＭＷ凝集体形成の変化は殆どないまたは全くない。しかし、３７℃でインキュベートした場合、全試料に対しこれらのパラメータにおいて時間依存性の増加が観察された。全製剤は、５サイクルの凍結融解後に殆ど変化がなかった。

【０８３６】

全体的に見て、ＰＳ２０（ヒスチジン／スクロース／ＰＳ２０）およびＦ６８（ヒスチジン／スクロース／Ｆ６８）条件は、高分子量凝集体形成のＳＥ－ＨＰＬＣ解析に基づく最良の結果を示し、ＨＲＳポリペプチドを３７℃で最大７日間インキュベートした場合、これらの薬剤は、ＨＭＷピークの形成を有意に低下させることができた。

【０８３７】

濁度形成（Ａ３４０）に関して、アルギニンの添加が、最良の結果を示し、高塩（２８

０ｍＭ　ＮａＣｌおよび１４０ｍＭ　ＮａＣｌ条件）がそれに続き、延長された期間３７℃でインキュベートした場合、これらの薬剤が、ＨＲＳポリペプチドの凝集および変性を有効に低下または防止することを示唆する。これらの条件下において、ポリソルベート８０、ポリソルベート２０およびプルロニックＦ６８も、ＨＰＬＣ解析により決定される通り、濁度およびＨＭＷ凝集体形成の両方を有効に低下させた。これらの試験において、スクロースおよびトレハロースは、おおよそ匹敵すると考えられ、両方の薬剤は、３７℃における延長されたインキュベーション後の濁度およびＨＭＷ形成の低下により決定される通り、タンパク質変性および凝集を有意に阻害した。

【０８３８】

これらの試験に基づき、ＨＲＳポリペプチドの安定化は、約７．０～７．５のｐＨ範囲内のヒスチジン緩衝液の利用により容易に得ることができる。驚くべきことに、約１００ｍＭ～約３００ｍＭの範囲内の塩化ナトリウムのさらなる添加は、これらの緩衝液の追加的な安定化をもたらし、６１℃までＴｍをさらに増加し（データ図示せず）、３７℃における延長されたインキュベーション後に変性を低下させた。安定性は、約０．２％～５％の範囲内のトレハロースまたは約０．２％～５％の範囲内のスクロース等、糖の添加によりさらに増強させることができる。また、特に、３７℃において延長された期間インキュベートした場合、約０．０１～１％の範囲内のポリソルベート２０もしくは８０またはプルロニックＦ６８を含む界面活性剤の添加は、全体的な安定性をさらに改善した。全体的なタンパク質安定性におけるさらなる改善は、本明細書に記載されている還元剤（抗酸化剤）および／またはキレート剤の添加によって為される可能性も高い。

【０８３９】

これらの試験に基づき、安定性の増強を提示するＨＲＳポリペプチドのための例示的な製剤は、表Ｅ１８に収載されている構成成分のうち１種または複数を含む緩衝液を含む。

【０８４０】

【表Ｅ１８】

表 E18
HRS ポリペプチドを安定化するための例示的な緩衝液構成成分

構成成分	機能	例示的な範囲
ヒスチジン	pH 緩衝	2mM～50mM; pH7.0～7.5
クエン酸塩	pH 緩衝	2mM～50mM; pH6.5～7.5
リン酸塩	pH 緩衝	2mM～50mM; pH7.0～7.5
NaCl	イオン強度	100mM～300mM
トレハロース	賦形剤	0.2%～5%
スクロース	賦形剤	0.2%～5%
アルギニン	賦形剤	0.2%～5%
ポリソルベート 20	界面活性剤	0.01～1%
ポリソルベート 20	界面活性剤	0.01～1%
プルロニック F68	界面活性剤	0.01～1%
システイン	抗酸化剤	0.1～5mM
メチオニン	抗酸化剤	0.1～5mM
N-アセチルシステイン	抗酸化剤	0.1～5mM
EDTA	キレート剤	0.1～2mM

【図１】

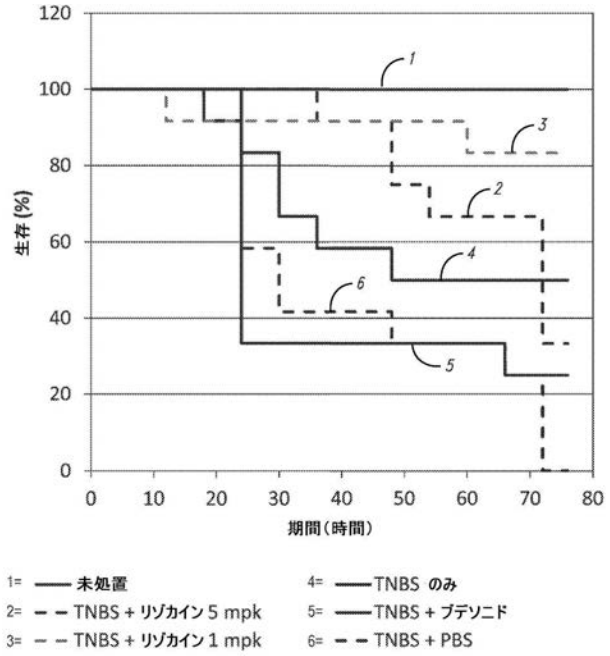


FIG. 1

【図２】

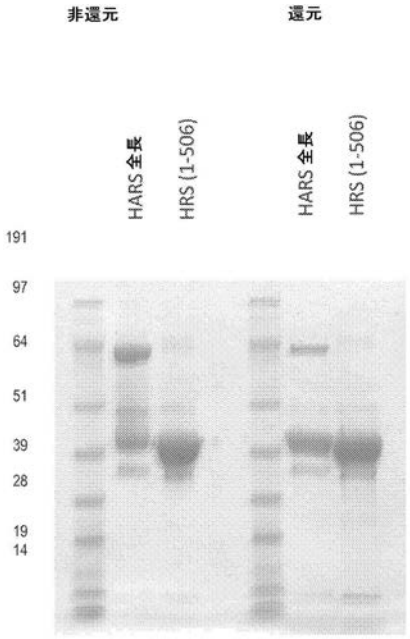


FIG. 2

【図３】

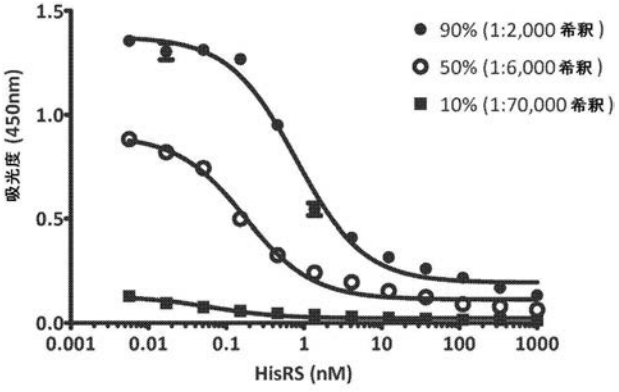


FIG. 3

【図４】

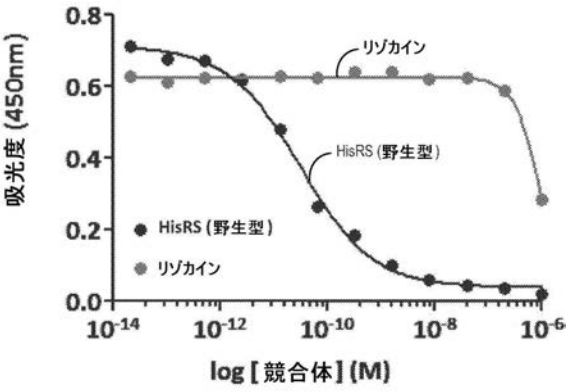


FIG. 4

【図５】

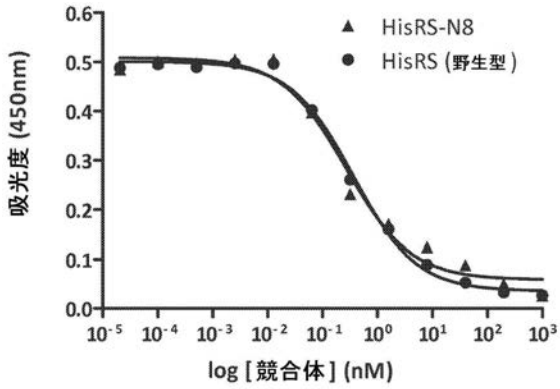


FIG. 5

【図６】

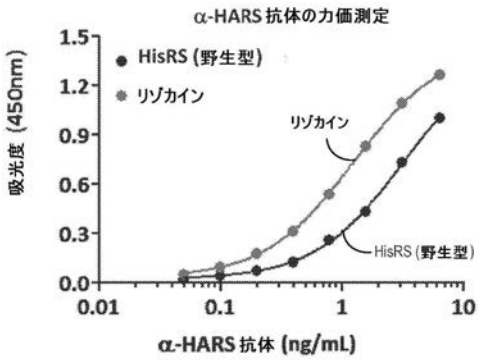


FIG. 6

【図７】

組換え体 (C-His)	1-506	1-60, 399-506	1-60	54-506	54-410	405-506	1-410

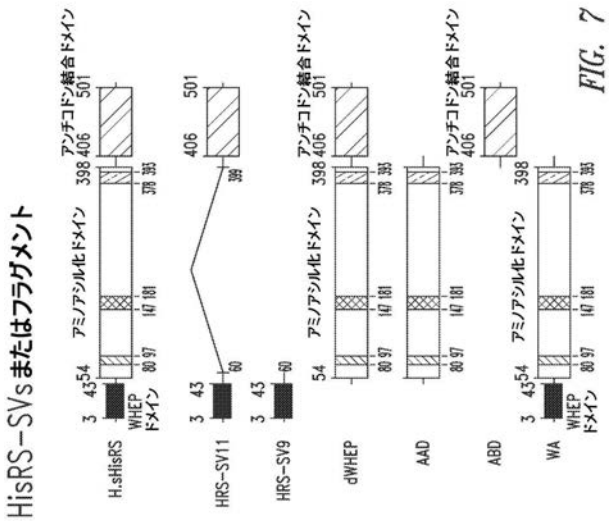


FIG. 7

【図８】

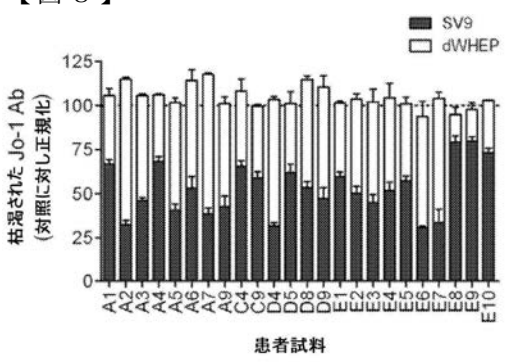


FIG. 8

【図９】

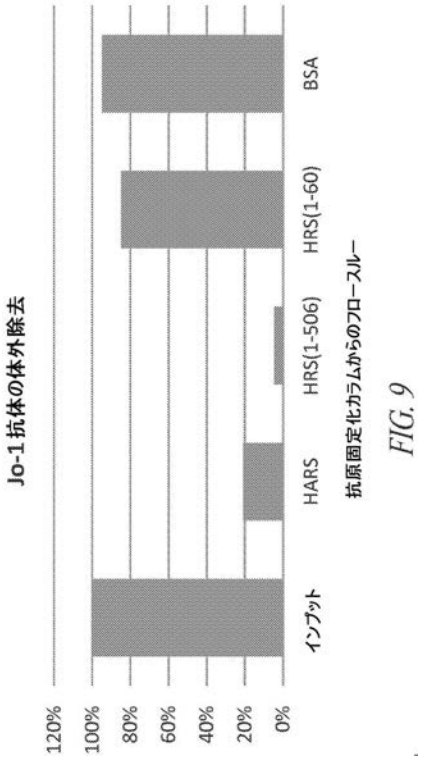


FIG. 9

【図１０Ａ】

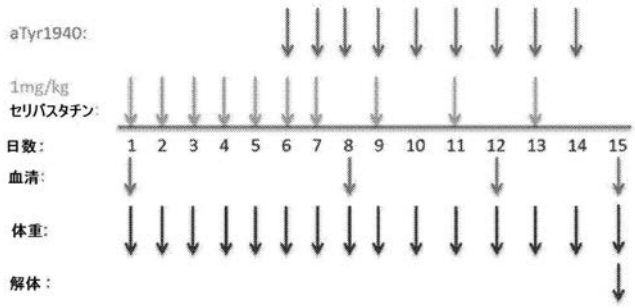


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

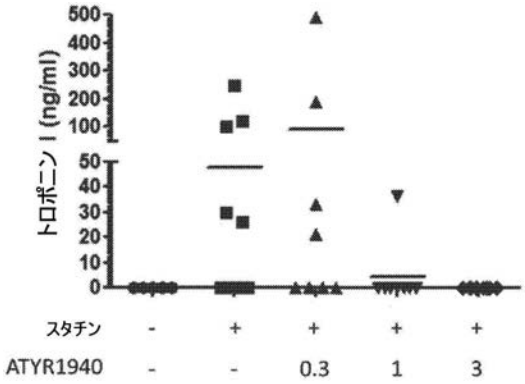


FIG. 10B

【図１１Ａ】

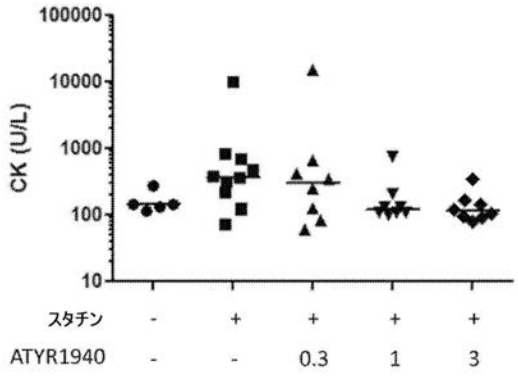


FIG. 11A

【図１１Ｂ】

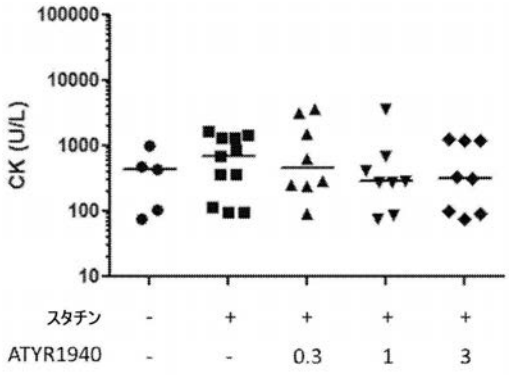


FIG. 11B

【図１２】

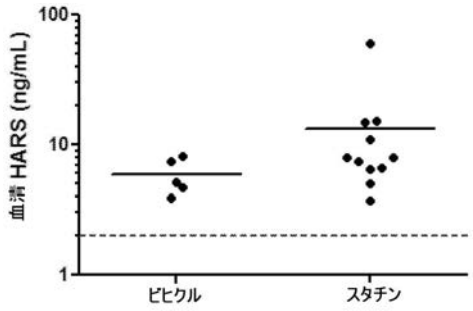


FIG. 12

【図１３】

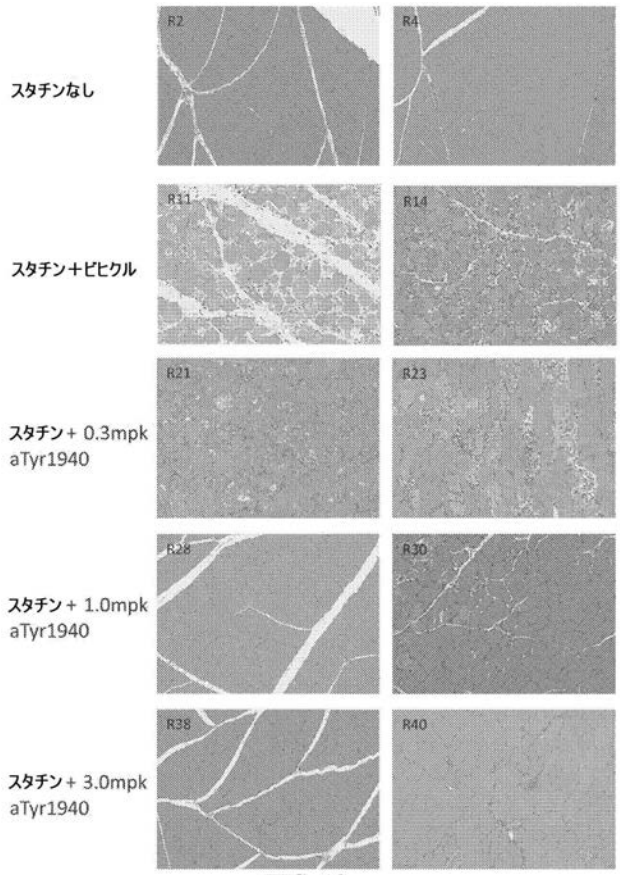


FIG. 13

【図１４】

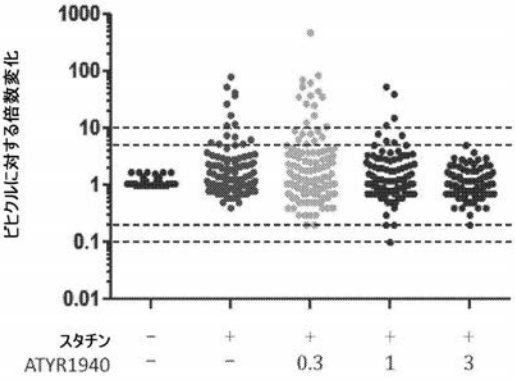


FIG. 14

【図１５Ａ】

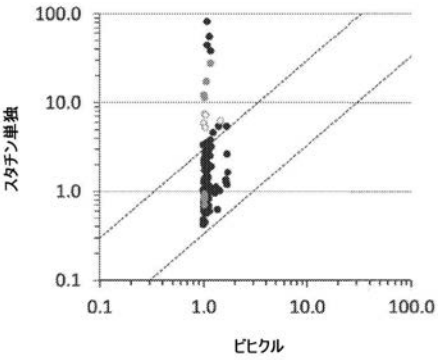


FIG. 15A

【図１５Ｂ】

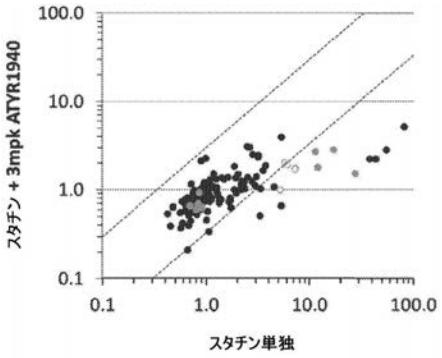


FIG. 15B

【図１６】

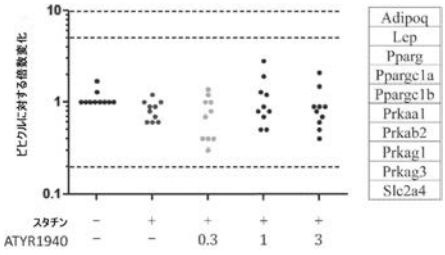


FIG. 16

【図１７】

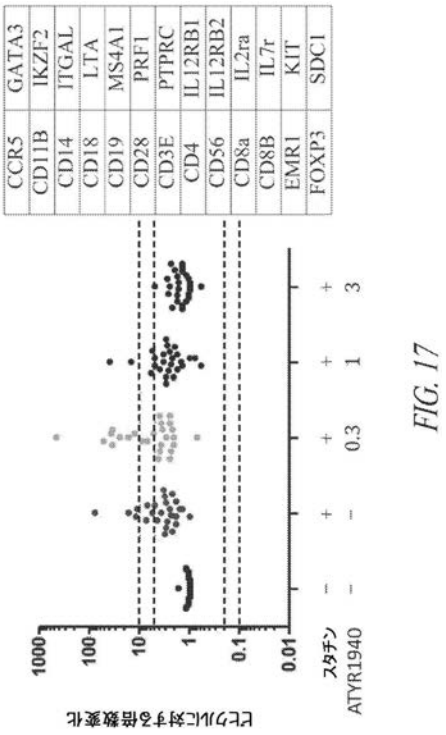


FIG. 17

【図１８Ａ】

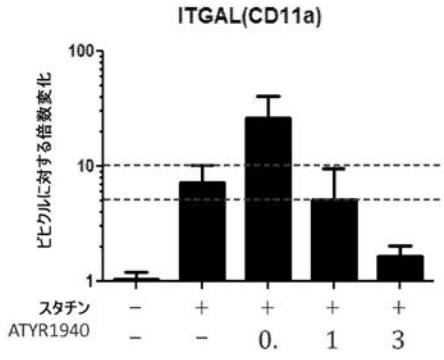


FIG. 18A

【図１８Ｂ】

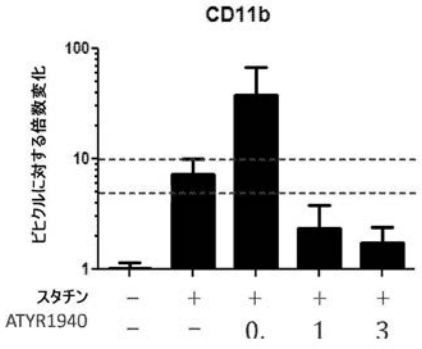


FIG. 18B

【図１８Ｃ】

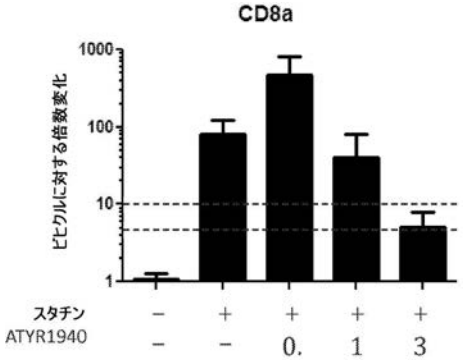


FIG. 18C

【図１８Ｄ】

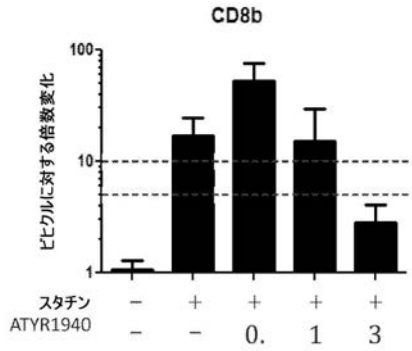


FIG. 18D

【図１９Ａ】

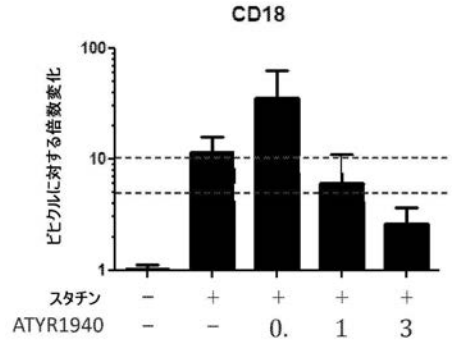


FIG. 19A

【図１９Ｂ】

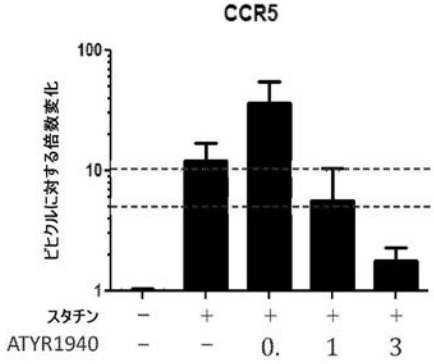


FIG. 19B

【図１９Ｃ】

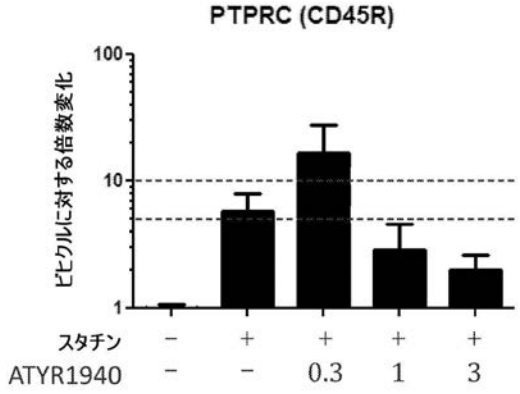


FIG. 19C

【図２０】

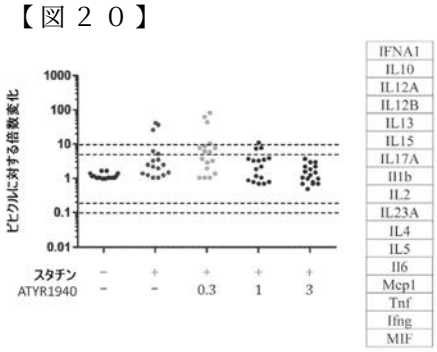


FIG. 20

【図２１Ａ】

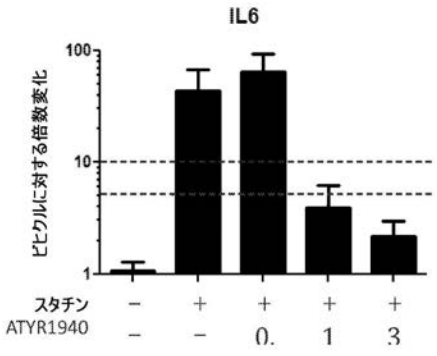


FIG. 21A

【図２１Ｂ】

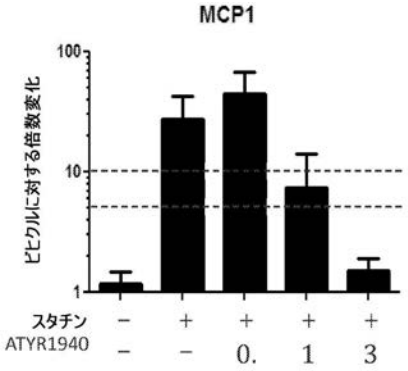


FIG. 21B

【図２１Ｃ】

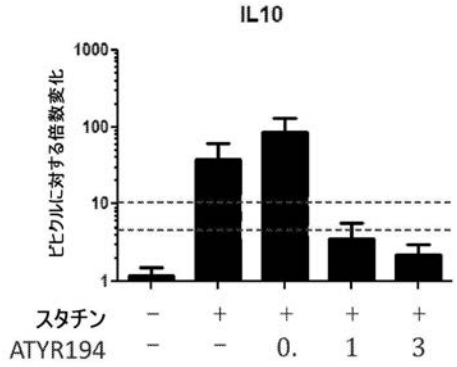


FIG. 21C

【図２１Ｄ】

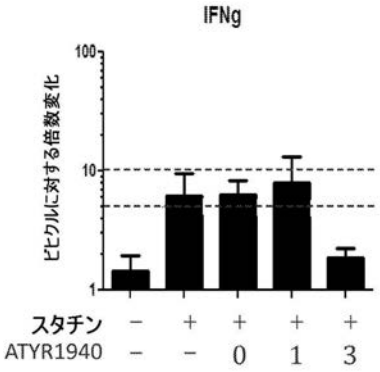


FIG. 21D

【図２２】

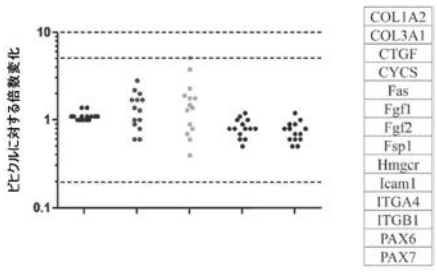


FIG. 22

【図２３】

Ikbkb	Mapk1	Mb	Myh2	Neb	Pdk4	Rps6kb1	Tnnc1	Tnnt1
Atp2a1	Camk2g	Capn3	Cav3	Cs	Dag1	Dysf	Emd	Hk2

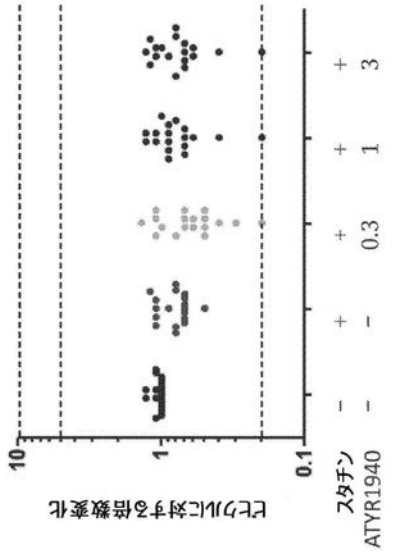
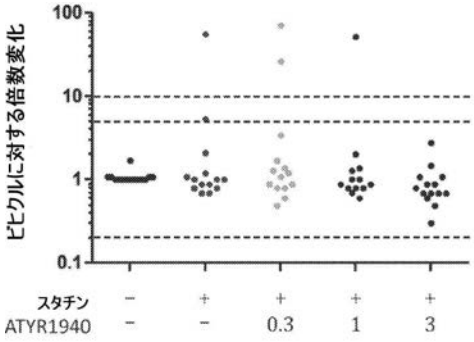


FIG. 23

【図２４Ａ】



Akt1
Akt2
Capn2
Casp3
Fbxo32
Foxo3
Mapk14
Mapk3
Mapk8
MMP3
Mmp9
Nfkb1
Nos2
Sgca

FIG. 24A

【図２４Ｂ】

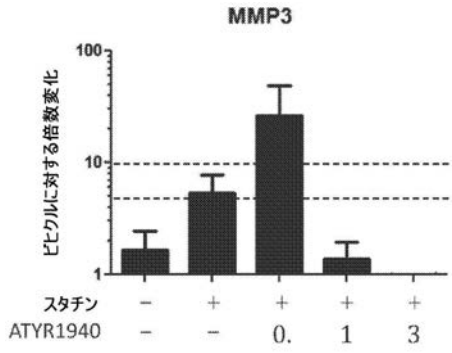


FIG. 24B

【図２４Ｃ】

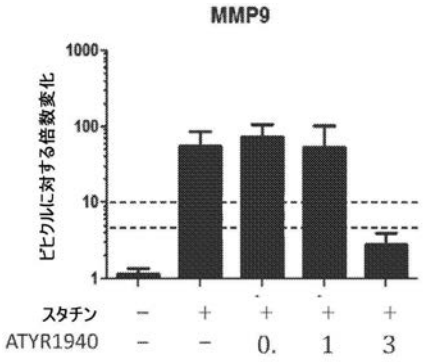


FIG. 24C

【図２５】

Mbnl1	Mef2a	Mef2c	Mstn	Musk	Myf5	Myf6	Myod1	Myog	Pax3	Ppp3ca	Rhoa	Tgfb1	Utrn	
Acta1	Acvr2b	Adrb2	Agrn	Bcl2	Bmp4	Cast	Cav1	Cmnb1	Dmd	Hdac5	Igf1	Igf2	Igfbp3	Igfbp5

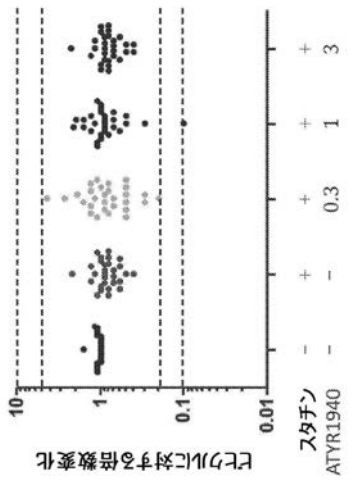


FIG. 25

【図２６Ａ】

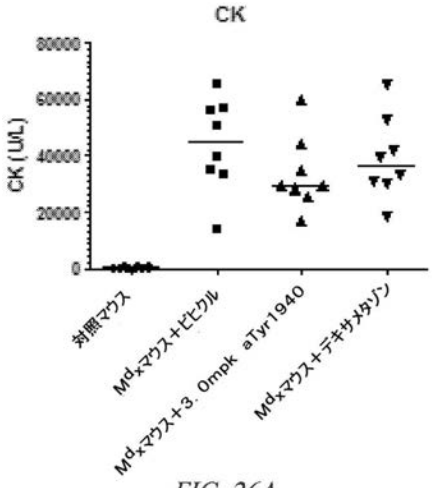


FIG. 26A

【図２６Ｂ】

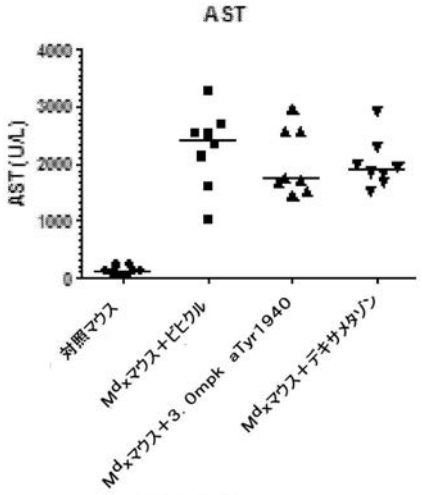


FIG. 26B

【図２６Ｃ】

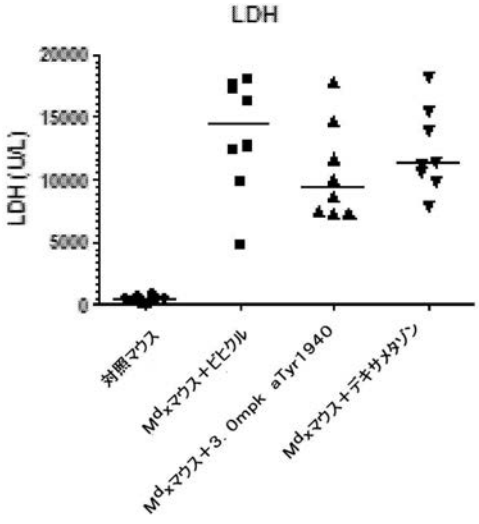


FIG. 26C

【図２７Ａ】

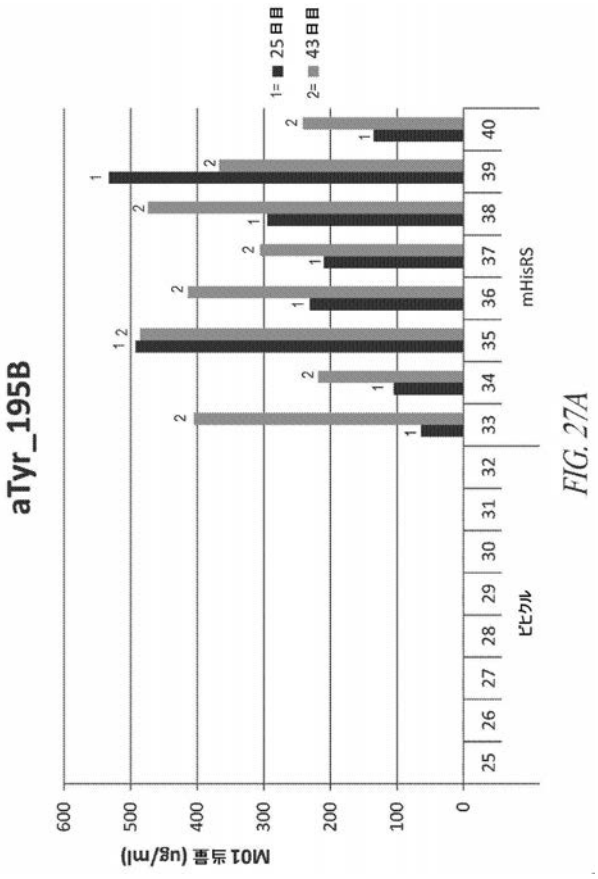


FIG. 27A

【図２７Ｂ】

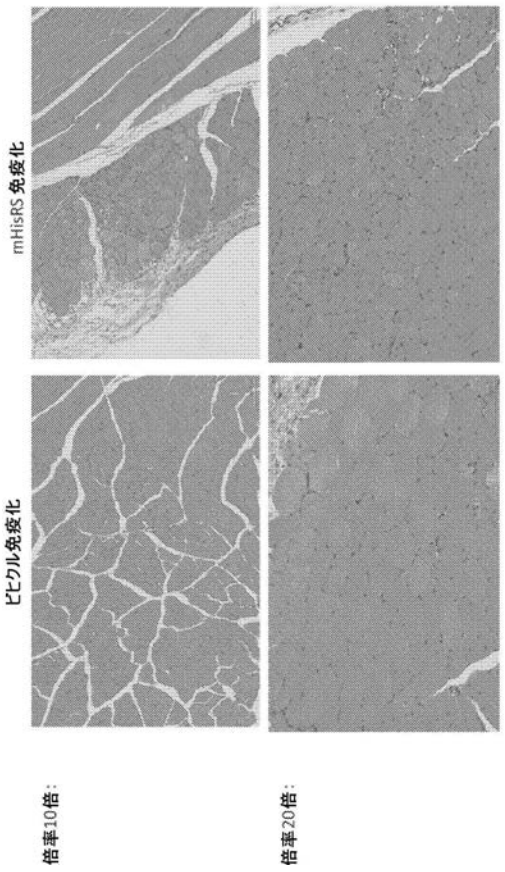


FIG. 27B

【図２８Ａ】

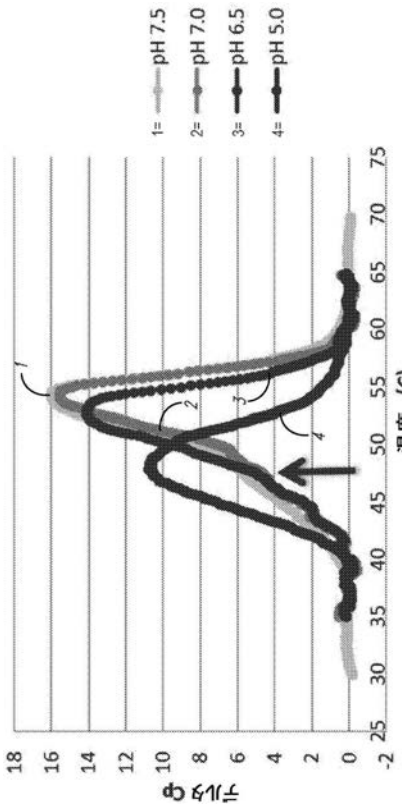


FIG. 28A

【図２８Ｂ】

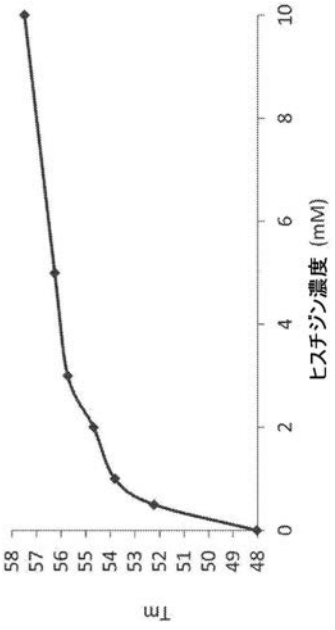


FIG. 28B

【配列表】
2017222665000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成29年7月26日(2017.7.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号７０と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く、長さが５００～５０６アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドをコードする修飾されたｍＲＮＡポリヌクレオチドを含む組成物であって、前記組成物が、実質的にエンドトキシンを含まない、前記組成物。
【請求項２】
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが５０５～５０６アミノ酸であり、配列番号７０と少なくとも９０％同一である、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０からなる、請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１６６を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１６６からなる、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのシステイン残基の変異を有する、請求項１に記載の組成物。
【請求項８】
前記少なくとも１つのシステイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、およびＣｙｓ４５５から選択される、請求項７に記載の組成物。
【請求項９】
ＨＲＳポリペプチドがＨＲＳ（１～５０６）およびＨＲＳ（２～５０６）から選択される、請求項１に記載の組成物。
【請求項１０】
脂質製剤に製剤化されている、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１】
前記脂質製剤が、リポソーム、リポプレックス（lipoplexe）、または脂質ナノ粒子である、請求項１０に記載の組成物。
【請求項１２】
ａ）筋ジストロフィーの処置；
ｂ）自己免疫疾患もしくは炎症疾患の処置；
ｃ）横紋筋融解症、筋肉の消耗、悪液質、筋肉炎症、もしくは筋傷害の処置；または
ｄ）ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置
において使用するための請求項１～１１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１３】
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジ

ストロフィー、および先天型筋ジストロフィーから選択される、請求項１２の（ａ）に記載の組成物。
【請求項１４】
前記筋ジストロフィーが顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーである、請求項１３に記載の使用のための組成物。
【請求項１５】
前記顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーが乳児または小児期に発症するものである、請求項１４に記載の使用のための組成物。
【請求項１６】
前記疾患が、炎症性筋疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、および関連障害を含めた炎症性筋疾患、多発性筋炎－強皮症オーバーラップ、封入体筋炎（ＩＢＭ）、抗合成酵素症候群、間質性肺疾患、関節炎、ならびにレイノー現象からなる群から選択される、請求項１２の（ｄ）に記載の組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００８８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００８８】
細胞外体液から抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）抗体を体外免疫吸着させるための方法であって、（ａ）被験体から得られた細胞外体液を準備するステップと、（ｂ）細胞外体液を、少なくとも１種のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素ポリペプチドが付着した生体適合性固体支持体と接触させ、それによって固体支持体上に抗ＨＲＳ抗体を捕捉するステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）からの細胞外体液を被験体中に再注入するステップとを含む、方法も含まれる。いくつかの態様では、抗ＨＲＳ抗体は、抗Ｊｏ－１抗体を含む。
以下に、本発明の基本的な諸特徴および種々の態様を列挙する。
［１］
配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが約２０～９０アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成物／ＨＲＳポリペプチドは、
ａ）少なくとも約９５％純粋であり、
ｂ）約５％未満凝集しており、
ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物。
［２］
前記ＨＲＳポリペプチドの少なくとも２０アミノ酸が、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する、［１］に記載の組成物。
［３］
前記ＨＲＳポリペプチドの少なくとも４０アミノ酸が、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する、［１］に記載の組成物。
［４］
前記ＨＲＳポリペプチドの少なくとも６０アミノ酸が、配列番号１の残基１～６７によって画定される領域に由来する、［１］に記載の組成物。
［５］
配列番号１と少なくとも９０％同一である８０以上の連続したアミノ酸を含む、長さが少なくとも約４００アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成物／ＨＲＳポリペプチドは、
ａ）少なくとも約９５％純粋であり、
ｂ）約５％未満凝集しており、
ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物。

［６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１と少なくとも９０％同一である２００以上のアミノ酸を含む、［５］に記載の組成物。
［７］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１と少なくとも９０％同一である４００以上のアミノ酸を含む、［５］に記載の組成物。
［８］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが少なくとも約５００アミノ酸である、［５］に記載の組成物。
［９］
前記ＨＲＳポリペプチドが、全長ヒトＨＲＳ（配列番号１）の配列を含む、［５］に記載の組成物。
［１０］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基５０５でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０５））かまたは配列番号１の残基５０６でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０６））、［９］に記載の組成物。
［１１］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのシステイン残基の変異を有する、［５］に記載の組成物。
［１２］
前記システイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される、［１１］に記載の組成物。
［１３］
配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが少なくとも約４００アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成物／ＨＲＳポリペプチドは、
ａ）少なくとも約９５％純粋であり、
ｂ）約５％未満凝集しており、
ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物。
［１４］
配列番号１と少なくとも９０％同一である、長さが少なくとも約５００アミノ酸のＨＲＳポリペプチドを含む、［１３］に記載の組成物。
［１５］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ヒトＨＲＳ）の配列を含む、［１３］に記載の組成物。
［１６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基５０５でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０５））かまたは配列番号１の残基５０６でトランケートされている（ＨＲＳ（１～５０６））、［１３］に記載の組成物。
［１７］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのシステイン残基の変異を有する、［１３］に記載の組成物。
［１８］
前記システイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される、［１７］に記載の組成物。
［１９］
配列番号７０（ＨＲＳ（１～５０６））と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く、長さが５００～５０６アミノ酸のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成

酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成物／ＨＲＳポリペプチドは、
ａ）少なくとも約９５％純粋であり、
ｂ）約５％未満凝集しており、
ｃ）実質的にエンドトキシンを含まない、治療用組成物。
［２０］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが５０５～５０６アミノ酸であり、配列番号７０と少なくとも９０％同一である、［１９］に記載の組成物。
［２１］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが５０６アミノ酸である、［１９］に記載の組成物。
［２２］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０を含む、［１９］に記載の組成物。
［２３］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０から本質的になる、［１９］に記載の組成物。
［２４］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０からなる、［１９］に記載の組成物。
［２５］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが５０５アミノ酸である、［１９］に記載の組成物。
［２６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））を含む、［２５］に記載の組成物。
［２７］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））から本質的になる、［２６］に記載の組成物。
［２８］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号７０の残基２～５０６（ＨＲＳ（２～５０６））からなる、［２７］に記載の組成物。
［２９］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのシステイン残基の変異を有する、［１９］に記載の組成物。
［３０］
前記少なくとも１つのシステイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、およびＣｙｓ４５５から選択される、［２９］に記載の組成物。
［３１］
前記ＨＲＳポリペプチドが、約４～４０℃、および約６．０～８．０のｐＨの範囲の同等の条件下で、配列番号１（全長ヒトＨＲＳ）のポリペプチドと比べて、生物活性、安定性、および／または均一性が増大している、［１９］から［３１］のいずれかに記載の組成物。
［３２］
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約２０～２５℃（室温）の温度、および約７．０～７．５のｐＨを含む、［３１］に記載の組成物。
［３３］
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約３７℃の温度、および約７．０～７．５のｐＨを含む、［３１］に記載の組成物。
［３４］
活性の増大が、少なくとも約１０％の非カノニカル生物活性の絶対的増大を含む、［３１］から［３３］のいずれかに記載の組成物。
［３５］

前記非カノニカル活性が、抗炎症活性、または抗Ｊｏ－１抗体への特異的結合である、［３４］に記載の組成物。
［３６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ＨＲＳ）の前記ポリペプチドと比べて、還元条件下での鎖間ジスルフィド形成が低減されている、［３１］から［３３］のいずれかに記載の組成物。
［３７］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ＨＲＳ）の前記ポリペプチドと比べて、電荷不均一性が低減している、［３１］から［３３］のいずれかに記載の組成物。
［３８］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ＨＲＳ）の前記ポリペプチドと比べて、溶液中での高分子量凝集体の形成が低減されている、［３１］から［３３］のいずれかに記載の組成物。
［３９］
均一性の増大が、配列番号１の前記ポリペプチドと比べて、前記ＨＲＳポリペプチドの単分散の少なくとも１０％の増大を含む、［３１］から［３３］のいずれかに記載の組成物。
［４０］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１（全長ＨＲＳ）の前記ポリペプチドと比べて、Ｅ．ｃｏｌｉ中で組換え産生される際の可溶性タンパク質の収率が増大している、［１９］から［３９］のいずれかに記載の組成物。
［４１］
前記ＨＲＳポリペプチドが、異種融合パートナー、必要に応じてＴ細胞リガンドに融合されている、［１］から［４０］のいずれかに記載の組成物。
［４２］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのＤ－アミノ酸を含む、［１］から［４０］のいずれかに記載の組成物。
［４３］
約０．０３ｍＭ～約１００ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む、［１］から［４２］のいずれかに記載の組成物。
［４４］
約２ｍＭ～約５０ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む、［４３］に記載の組成物。
［４５］
約４０ｍＭ～約６０ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む、［４３］に記載の組成物。
［４６］
約４５ｍＭ～約５５ｍＭの範囲の濃度で緩衝剤を含む、［４３］に記載の組成物。
［４７］
約５０ｍＭの濃度で緩衝剤を含む、［４３］に記載の組成物。
［４８］
前記緩衝剤が、ヒスチジン緩衝剤、クエン酸緩衝剤、またはリン酸緩衝剤である、［４３］から［４７］のいずれかに記載の組成物。
［４９］
前記緩衝剤がヒスチジン緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、約４～４０℃、および約７．０～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、該ヒスチジン緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している、［４８］に記載の組成物。
［５０］
前記緩衝剤がクエン酸緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、約４～４０℃、および約６．５～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、該クエン酸緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している、［４８］に記

載の組成物。
［５１］
前記緩衝剤がリン酸緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、約４～４０℃、および約７．０～７．５のｐＨの範囲の同等の条件下で、該リン酸緩衝剤を含まない同等の組成物中の対応するＨＲＳポリペプチドと比べて、安定性が増大している、［４８］に記載の組成物。
［５２］
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約５℃の温度を含む、［４９］から［５１］のいずれかに記載の組成物。
［５３］
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約２０～２５℃（室温）の温度を含む、［４９］から［５１］のいずれかに記載の組成物。
［５４］
前記条件が、必要に応じて約１、２、３、４、５、６、または７日間の期間にわたって、約３７℃の温度を含む、［４９］から［５１］のいずれかに記載の組成物。
［５５］
安定性の増大が熱安定性を含み、前記ＨＲＳポリペプチドの融解温度（Ｔｍ）が、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の前記組成物中の前記対応するＨＲＳポリペプチドのものより少なくとも約５℃高い、［４９］から［５４］のいずれかに記載の組成物。
［５６］
安定性の増大が熱安定性を含み、前記ＨＲＳポリペプチドの融解温度が、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の前記組成物中の前記対応するＨＲＳポリペプチドのものより少なくとも約１０％遅い速度でアンフォールドさせる、［４９］から［５４］のいずれかに記載の組成物。
［５７］
その他は同等の条件下で、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の組成物と比べて、凝集および／または沈降が低減している、［４９］から［５６］のいずれかに記載の組成物。
［５８］
凝集が、Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、少なくとも約１０％低減されている、［５７］に記載の組成物。
［５９］
その他は同等の条件下で、前記緩衝剤を含まない、かつ／または前記ｐＨ範囲外の組成物と比べて、高分子量凝集体が低減している、［４９］から［５８］のいずれかに記載の組成物。
［６０］
前記緩衝剤がヒスチジン緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く、［５５］から［５９］のいずれかに記載の組成物。
［６１］
前記緩衝剤がクエン酸緩衝剤であり、前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠く、［５５］から［５９］のいずれかに記載の組成物。
［６２］
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）である、［６０］または６１に記載の組成物。
［６３］
約１００～３００ｍＭの範囲の濃度で、必要に応じて約１４０ｍＭで、塩化ナトリウム

（ＮａＣｌ）を含む、［１］から［６２］のいずれかに記載の組成物。
［６４］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基１～５０６または２～５０６と少なくとも９０％同一であり、配列番号１の残基５０７～５０９を欠き、必要に応じて、少なくとも約６０℃の融解温度（Ｔｍ）を有する、［６３］に記載の組成物。
［６５］
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）であり、必要に応じて、少なくとも約６０℃の融解温度（Ｔｍ）を有する、［６４］に記載の組成物。
［６６］
１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤を含む、［１］から［６５］のいずれかに記載の組成物。
［６７］
前記１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤が、スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、アルギニン、グリシン、およびグリセロールから選択される、［６６］に記載の組成物。
［６８］
前記１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤が、約０．２～５．０％の範囲の濃度である、［６６］または６７に記載の組成物。
［６９］
前記薬学的に許容される賦形剤が、約１～３％のスクロース、必要に応じて約２％のスクロースである、［６８］に記載の組成物。
［７０］
前記薬学的に許容される賦形剤が、約１～３％のトレハロース、必要に応じて約２％のトレハロースである、［６８］に記載の組成物。
［７１］
１種または複数種の界面活性剤を含む、［１］から［７０］のいずれかに記載の組成物。
［７２］
前記界面活性剤が、ポリソルベートまたはポロキサマーである、［７１］に記載の組成物。
［７３］
前記ポリソルベートが、ポリソルベート２０（ＰＳ２０）、ポリソルベート４０（ＰＳ４０）、ポリソルベート６０（ＰＳ６０）、またはポリソルベート８０（ＰＳ８０）である、［７２］に記載の組成物。
［７４］
前記ポリソルベートがＰＳ２０である、［７３］に記載の組成物。
［７５］
前記ポロキサマーがプルロニックＦ６８である、［７２］に記載の組成物。
［７６］
前記界面活性剤が、約０．１～５．０％（ｗ／ｖ）の範囲で存在する、［７１］から［７４］のいずれかに記載の組成物。
［７７］
前記界面活性剤が、約０．０５％（ｗ／ｖ）のＰＳ２０である、［７６］に記載の組成物。
［７８］
抗酸化化合物を含む、［１］から［７４］のいずれかに記載の組成物。
［７９］
前記抗酸化化合物が、システイン、メチオニン、およびＮ－アセチルシステイン（ＮＡＣ）から選択される、［７８］に記載の組成物。

［８０］
前記抗酸化化合物が、約０．１～５．０ｍＭの濃度範囲で存在する、［７８］または７９に記載の組成物。
［８１］
キレート化剤を含む、［１］から［８０］のいずれかに記載の組成物。
［８２］
前記キレート化剤がエチレンジアミンテトラアセテート（ＥＤＴＡ）である、［８１］に記載の組成物。
［８３］
前記キレート化剤が、約０．１～２．０ｍＭの濃度範囲で存在する、［８１］または［８２］に記載の組成物。
［８４］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約１０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する、［１］から［８３］のいずれかに記載の組成物。
［８５］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約２５ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する、［１］から［８３］のいずれかに記載の組成物。
［８６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約５０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する、［１］から［８３］のいずれかに記載の組成物。
［８７］
Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、約０．５未満の濁度を有する、［１］から［８６］のいずれかに記載の組成物。
［８８］
Ａ３４０での吸光度が、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、［８７］に記載の組成物。
［８９］
Ａ３４０での吸光度が、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、［８７］に記載の組成物。
［９０］
Ａ３４０での吸光度が、少なくとも１、２、３、４、または５回、前記組成物を凍結融解した後に測定される、［８７］に記載の組成物。
［９１］
Ａ５８０での吸光度によって測定した場合、約０．６未満の不透明度を有する、［１］から［８６］のいずれかに記載の組成物。
［９２］
Ａ５８０での吸光度が、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、［９１］に記載の組成物。
［９３］
Ａ５８０での吸光度が、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、［９１］に記載の組成物。
［９４］
Ａ５８０での吸光度が、少なくとも１、２、３、４、または５回、前記組成物を凍結融解した後に測定される、［９１］に記載の組成物。
［９５］
約３％未満の高分子量凝集体を有する、［１］から［４］のいずれかに記載の組成物。
［９６］
高分子量（ＨＭＷ）凝集が、３７℃で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、［９５］に記載の組成物。
［９７］

高分子量（ＨＭＷ）凝集が、室温で少なくとも約１、２、３、４、５、６、または７日間インキュベートした後に測定される、［９５］に記載の組成物。

［９８］

高分子量凝集が、少なくとも１、２、３、４、または５回、前記組成物を凍結融解した後に測定される、［９５］に記載の組成物。

［９９］

前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約５０℃の前記組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する、［１］から［９８］のいずれかに記載の組成物。

［１００］

前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約５５℃の前記組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する、［９９］に記載の組成物。

［１０１］

前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約６０℃の前記組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する、［１００］に記載の組成物。

［１０２］

前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも約９０％単分散である、［１］～１０１のいずれかに記載の組成物。

［１０３］

約５０ｍＭのＬ－ヒスチジン、約１４０ｍＭのＮａＣｌ、約２％のトレハロース、約０．０５％のポリソルベート２０（ＰＳ２０）を含み、約７．０～７．４のｐＨを有する、［１］～１０２のいずれかに記載の組成物。

［１０４］

約５０ｍＭのＬ－ヒスチジン、約１４０ｍＭのＮａＣｌ、約２％のスクロース、約０．０５％のポリソルベート２０（ＰＳ２０）を含み、約７．０～７．４のｐＨを有する、項目１～１０２のいずれかに記載の組成物。

［１０５］

前記ＨＲＳポリペプチドが、ＨＲＳ（１～５０６）またはＨＲＳ（２～５０６）であり、少なくとも約６０℃の前記組成物中での融解温度（Ｔｍ）を有する、［１０３］または［１０４］に記載の組成物。

［１０６］

Ａ３４０での吸光度によって測定した場合、約０．１未満、または約０．０５未満の濁度を有する、［１０５］に記載の組成物。

［１０７］

Ａ５８０での吸光度によって測定した場合、約０．１未満、または約０．０５未満の不透明度を有する、［１０５］に記載の組成物。

［１０８］

約２％未満または約１％未満の高分子量凝集体を有する、［１０５］に記載の組成物。

［１０９］

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、該ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１つのカノニカルまたは非カノニカル機能に取って代わることができる、治療用組成物。

［１１０］

前記ＨＲＳポリペプチドが、最大約5×10^{-7}Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない、［１０９］に記載の治療用組成物。

［１１１］

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、該自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープ

を含み、該ＨＲＳポリペプチドは、寛容化を引き起こすことができる、治療用組成物。
［１１２］
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、哺乳動物ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸を含み、該ＨＲＳポリペプチドは、該自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該核酸は、発現コントロール配列に作動可能にカップリングしており、該核酸が発現されると寛容化が引き起こされる、治療用組成物。
［１１３］
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、組換え宿主細胞を含み、該宿主細胞は、該自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含む少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現し、該核酸は、該宿主細胞内で該ＨＲＳの発現を可能にするように発現コントロール配列に作動可能にカップリングしている、治療用組成物。
［１１４］
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、該自己抗体に特異的な抗体または結合タンパク質を含み、該抗体または結合タンパク質は、天然ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への該自己抗体の結合を遮断する、治療用組成物。
［１１５］
少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、炎症疾患の処置において使用するための治療用組成物であって、該ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物。
［１１６］
少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、筋ジストロフィーの処置において使用するための治療用組成物であって、該ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物。
［１１７］
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、および先天型筋ジストロフィーから選択される、［１１６］に記載の治療用組成物。
［１１８］
少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む、横紋筋融解症、筋肉の消耗、悪液質、筋肉炎症、または筋傷害の処置において使用するための治療用組成物であって、該ＨＲＳポリペプチドは、少なくとも１種の非カノニカル活性を有する、治療用組成物。
［１１９］
自己免疫疾患または炎症疾患を処置するための医薬の調製におけるヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）ポリペプチドの使用。
［１２０］
前記治療用組成物またはＨＲＳポリペプチドが、［１］から［１０８］のいずれかのように定義されている、［１０９］～［１１８］のいずれかに記載の治療用組成物または［１１９］に記載の使用。
［１２１］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約１０～約６０アミノ酸である、［１０９］～［１１８］のいずれかに記載の治療用組成物または［１１９］に記載の使用。
［１２２］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約６０～約８０アミノ酸である、［１０９］～［１１８］のいずれかに記載の治療用組成物または［１１９］に記載の使用。
［１２３］

前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約８０～約２００アミノ酸である、［１０９］～［１１８］のいずれかに記載の治療用組成物または［１１９］に記載の使用。
［１２４］
前記ＨＲＳポリペプチドが全長である、［１０９］～［１１８］のいずれかに記載の治療用組成物または［１１９］に記載の使用。
［１２５］
前記ＨＲＳポリペプチドが、配列番号１の残基５０５または５０６でトランケートされている、［１０９］～［１１８］のいずれかに記載の治療用組成物または［１１９］に記載の使用。
［１２６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、システイン残基で少なくとも１つの変異を有する、［１０９］～［１１８］のいずれかに記載の治療用組成物または［１１９］に記載の使用。
［１２７］
前記システイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される、［１２６］に記載の治療用組成物。
［１２８］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのＤアミノ酸を含む、前記［１］から［１２７］のいずれかに記載の治療用組成物または使用。
［１２９］
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＷＨＥＰドメインを含むかまたはそれから本質的になる、前記［１］から［１２８］のいずれかに記載の治療用組成物または使用。
［１３０］
前記ＨＲＳポリペプチドが、
ａ）配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列、または
ｂ）表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列
を含む、前記［１］から［１２９］のいずれかに記載の治療用組成物または使用。
［１３１］
前記ＨＲＳポリペプチドが、異種タンパク質に融合されている、前記［１］から［１３０］のいずれかに記載の治療用組成物または使用。
［１３２］
前記異種タンパク質がＴ細胞リガンドを含む、［１３１］に記載の治療用組成物または使用。
［１３３］
自己抗体に関連した疾患を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞、または
ｄ）該自己抗体に特異的な抗体もしくは結合タンパク質
のうちの１種または複数を含む治療用組成物を投与するステップを含む、方法。
［１３４］
前記治療用組成物が、疾患症状が出現する前に、前記被験体に投与される、［１３３］に記載の方法。
［１３５］
前記自己抗体が、ヒトヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的である、［１３３］または１３４に記載の方法。
［１３６］

前記ＨＲＳポリペプチドが、前記疾患特異的自己抗体によって認識される前記ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の少なくとも１種のエピトープを含む、［１３５］に記載の方法。
［１３７］
前記ＨＲＳポリペプチドが、前記自己抗体の天然ヒトヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への結合を遮断する、［１３６］に記載の方法。
［１３８］
前記ＨＲＳポリペプチドが、自己反応性Ｔ細胞のクローン除去を引き起こす、［１３３］に記載の方法。
［１３９］
前記ＨＲＳポリペプチドが、自己免疫応答に関与するＴ細胞の機能的不活化を引き起こす、［１３３］に記載の方法。
［１４０］
前記ＨＲＳポリペプチドが、筋肉炎症または肺炎症の低減をもたらす、［１３３］に記載の方法。
［１４１］
前記ＨＲＳポリペプチドが、寛容を誘導する、［１３３］に記載の方法。
［１４２］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約１０～約６０アミノ酸である、［１３３］から［１４１］のいずれかに記載の方法。
［１４３］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約４０～約８０アミノ酸である、［１３３］から［１４１］のいずれかに記載の方法。
［１４４］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約８０～約２００アミノ酸である、［１３３］から［１４１］のいずれかに記載の方法。
［１４５］
前記ＨＲＳポリペプチドが全長である、［１３３］から［１４１］のいずれかに記載の方法。
［１４６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、残基５０５または５０６でトランケートされている、［１３３］から［１４１］のいずれかに記載の方法。
［１４７］
前記ＨＲＳポリペプチドが、システイン残基で少なくとも１つの変異を有する、［１３３］から［１４１］のいずれかに記載の方法。
［１４８］
前記システイン残基が、Ｃｙｓ１７４、Ｃｙｓ１９１、Ｃｙｓ２２４、Ｃｙｓ２３５、Ｃｙｓ４５５、Ｃｙｓ５０７、およびＣｙｓ５０９から選択される、［１４７］に記載の方法。
［１４９］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのＤ－アミノ酸を含む、［１３３］から［１４８］のいずれかに記載の方法。
［１５０］
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＷＨＥＰドメインを含むかまたはそれから本質的になる、［１３３］から［１４９］のいずれかに記載の方法。
［１５１］
前記ＨＲＳポリペプチドが、
ａ）配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列、または
ｂ）表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％

、もしくは９５％同一のアミノ酸配列
を含む、［１３３］から［１５０］のいずれかに記載の方法。
［１５２］
前記ＨＲＳポリペプチドが、異種タンパク質に融合されている、［１３３］から［１５１］のいずれかに記載の方法。
［１５３］
前記異種タンパク質がＴ細胞リガンドを含む、［１５２］に記載の方法。
［１５４］
前記組成物が、経口、鼻腔内、経肺、筋肉内または非経口投与を介する送達のために製剤化される、［１３３］から［１５３］のいずれかに記載の方法。
［１５５］
前記疾患が、炎症性筋疾患、多発性筋炎、皮膚筋炎、および関連障害を含めた炎症性筋疾患、多発性筋炎－強皮症オーバーラップ、封入体筋炎（ＩＢＭ）、抗合成酵素症候群、間質性肺疾患、関節炎、ならびにレイノー現象からなる群から選択される、［１３３］から［１５４］のいずれかに記載の方法。
［１５６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、前記被験体に由来する血清中の抗体によって認識される少なくとも１種の免疫優性エピトープを含む、［１３３］から［１５５］のいずれかに記載の方法。
［１５７］
前記ＨＲＳポリペプチドが、ヒト組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩ分子に結合する、［１３３］から［１５６］のいずれかに記載の方法。
［１５８］
前記核酸が、発現コントロール配列に作動可能にカップリングしており、前記核酸が発現されると寛容化が引き起こされる、［１３３］に記載の方法。
［１５９］
前記治療用組成物が、リポソーム、ミセル、エマルジョン、および細胞からなる群から選択される送達ビヒクルを含む、［１３３］に記載の方法。
［１６０］
組織炎症を低減する方法であって、それを必要とする被験体に、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法。
［１６１］
前記組織が、筋肉、肺、および皮膚から選択される、［１６０］に記載の方法。
［１６２］
筋肉炎症または肺炎症を低減する方法であって、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含む、方法。
［１６３］
筋ジストロフィーを処置する方法であって、それを必要とする被験体に、
ａ）ＨＲＳポリペプチド、
ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または
ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞
のうちの１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法。
［１６４］
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフ

ィー、エメリードレイフス型筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、筋緊張性ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位型筋ジストロフィー、および先天型筋ジストロフィーから選択される、［１６３］に記載の方法。

［１６５］

横紋筋融解症、筋肉の消耗、悪液質、筋肉炎症、または筋傷害を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、

ａ）ＨＲＳポリペプチド、

ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または

ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞

のうちの１種または複数を含む組成物を投与するステップを含む、方法。

［１６６］

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する寛容を誘導する方法であって、

ａ）ＨＲＳポリペプチド、

ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または

ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞

のうちの１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該組成物を投与すると、該自己抗原に対する寛容化が引き起こされる、方法。

［１６７］

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する自己免疫応答に関与するＴ細胞のセットまたはサブセットを排除するための方法であって、

ａ）ＨＲＳポリペプチド、

ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または

ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞

のうちの１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該組成物を投与すると、自己反応性Ｔ細胞のクローン除去が引き起こされる、方法。

［１６８］

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨｉｓＲＳ）自己抗原に対する自己免疫応答に関与するＴ細胞内でアネルギーを誘導するための方法であって、

ａ）ＨＲＳポリペプチド、

ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、または

ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞

のうちの１種または複数を含む組成物を被験体に投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、自己抗体によって特異的に認識される少なくとも１種のエピトープを含み、該組成物を投与すると、該自己免疫応答に関与する該Ｔ細胞の機能的不活化が引き起こされる、方法。

［１６９］

ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素の不足に関連した疾患を処置するための補充療法であって、それを必要とする被験体に、

ａ）ＨＲＳポリペプチド、

ｂ）異種ＨＲＳポリペプチドをコードする組換え核酸、

ｃ）少なくとも１種の異種ＨＲＳポリペプチドを発現する組換え宿主細胞、または

ｄ）自己抗体に特異的な抗体もしくは結合タンパク質

のうちの１種または複数を含む治療用組成物を投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素不足を機能的に補償する、補充療法。

［１７０］

自己免疫疾患または炎症疾患を処置するための方法であって、それを必要とする被験体

に、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む治療用組成物を投与するステップを含む、方法。
［１７１］
前記ＨＲＳタンパク質が、最大約５×１０$^{-7}$Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない、前記［１］から［１７０］のいずれかに記載の方法。
［１７２］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約１０～約６０アミノ酸である、前記［１３３］から［１７１］のいずれかに記載の方法。
［１７３］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約６０～約８０アミノ酸である、前記［１３３］から［１７２］のいずれかに記載の方法。
［１７４］
前記ＨＲＳポリペプチドが、長さが約８０～約２００アミノ酸である、前記［１３３］から［１７３］のいずれかに記載の方法。
［１７５］
前記ＨＲＳポリペプチドが全長である、前記［１３３］から［１７４］のいずれかに記載の方法。
［１７６］
前記ＨＲＳポリペプチドが、少なくとも１つのＤアミノ酸を含む、前記［１３３］から［１７５］のいずれかに記載の方法。
［１７７］
前記ＨＲＳポリペプチドが、ＷＨＥＰドメインを含むかまたはそれから本質的になる、前記［１３３］から［１７６］のいずれかに記載の方法。
［１７８］
前記ＨＲＳポリペプチドが、
ａ）配列番号１～２３、３９、４１、４３、７０～７１、７４～１５３、１６０～１７２、もしくは１７６～１８２のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列、または
ｂ）表Ｄ１、Ｄ３～Ｄ６、もしくはＤ８中の配列のいずれかと少なくとも８０％、９０％、もしくは９５％同一のアミノ酸配列
を含む、前記［１３３］から［１７７］のいずれかに記載の方法。
［１７９］
前記ＨＲＳポリペプチドが、異種タンパク質に融合されている、前記［１３３］から［１７８］のいずれかに記載の方法。
［１８０］
前記異種タンパク質が、免疫認識ドメイン、または免疫共刺激ドメインを含む、［１７９］に記載の方法。
［１８１］
前記組成物が、経口、鼻腔内、経肺、筋肉内または非経口投与を介する送達のために製剤化される、前記［１３３］から［１８０］のいずれかに記載の方法。
［１８２］
試料中のＨＲＳポリペプチドまたはその断片の存在またはレベルを判定する方法であって、該試料を、該ＨＲＳポリペプチドに特異的に結合する１種または複数種の結合剤と接触させるステップと、該結合剤の存在または非存在を検出し、それによって該ＨＲＳポリペプチドの存在またはレベルを判定するステップとを含む、方法。
［１８３］
特定のＨＲＳポリペプチドに対する抗ＨＲＳポリペプチド抗体のエピトープ特異性を判定する方法であって、該抗体を１種または複数種のＨＲＳポリペプチドと接触させるステップと、抗体結合の存在または非存在を検出し、それによって該抗体の該エピトープ特異

性を判定するステップとを含む、方法。
［１８４］
ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、少なくとも１種のＨＲＳポリペプチドを含む治療用組成物を投与するステップを含み、該ＨＲＳポリペプチドは、最大約1×10^{-7}Ｍの濃度まで、競合性ＥＬＩＳＡにおいてヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素への疾患関連自己抗体結合を有意に競合しない、方法。
［１８５］
ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を有するリスクのあるヒト被験体を同定するための方法であって、
ａ）該被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、
ｂ）該被験体がヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素または該ＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして該被験体を同定するステップと
を含む、方法。
［１８６］
前記被験体の血清中のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度が約２マイクロモル濃度より高い場合、該被験体が、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして同定される、［１８５］に記載の方法。
［１８７］
前記被験体の血清中のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の濃度が約２マイクロモル濃度より高い場合、該被験体が、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして同定される、［１８５］に記載の方法。
［１８８］
細胞外体液から抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＨＲＳ）抗体を体外免疫吸着させるための方法であって、
（ａ）被験体から得られた該細胞外体液を準備するステップと、
（ｂ）該細胞外体液を、少なくとも１種のヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素ポリペプチドが付着した生体適合性固体支持体と接触させ、それによって該固体支持体上に該抗ＨＲＳ抗体を捕捉するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）からの該細胞外体液を該被験体中に再注入するステップと
を含む、方法。
［１８９］
前記抗ＨＲＳ抗体がＪｏ－１抗体を含む、［１８８］に記載の方法。
［１９０］
自己免疫状態または炎症状態を有するヒト被験体を処置するためのＨＲＳポリペプチドを選択するための方法であって、
ａ）該被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、
ｂ）野生型ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素と比較して該抗ヒスチジルｔＲＮＡ合成酵素抗体に対する親和性が低減しているＨＲＳポリペプチドを選択するステップと
を含む、方法。
［１９１］
ヒト被験体の疾患進行を予後判定するための方法であって、
ａ）該被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、
ｂ）該被験体が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素またはＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、より重篤な疾患を生じさせるリスクがあるとして該被験体を同定するステップと

を含む、方法。
［１９２］
ＨＲＳポリペプチド投与に対する被験体の応答を予測するための方法であって、
ａ）該被験体における抗ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素抗体の抗体レベルまたはエピトープ特異性を判定するステップと、
ｂ）該被験体が、ヒスチジル－ｔＲＮＡ合成酵素または該ＨＲＳポリペプチドに対する検出可能な抗体を有する場合、ＨＲＳポリペプチド投与に対する有害な免疫応答を生じさせるリスクがあるとして該被験体を同定するステップと
を含む、方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 39/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｄ	
Ａ６１Ｋ 47/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	
Ａ６１Ｋ 47/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/02		
Ａ６１Ｋ 47/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/04		
Ａ６１Ｋ 47/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/10		
Ａ６１Ｋ 47/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/12		
Ａ６１Ｋ 47/20	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18		
Ａ６１Ｋ 47/22	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/20		
Ａ６１Ｋ 47/26	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/22		
Ａ６１Ｋ 47/34	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/26		
Ａ６１Ｐ 9/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/34		
Ａ６１Ｐ 11/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ａ６１Ｐ 19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｐ 21/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00		
Ａ６１Ｐ 37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ａ６１Ｋ 38/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ｇ０１Ｎ 33/573	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/04		
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/573	Ａ	
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｎ	
Ｃ１２Ｎ 9/00	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	
		Ｃ１２Ｎ	9/00		

(74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 チャン, カイル ピー.

アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２０１１，　カーディフ，　デバン　ロード　１６１５
(72)発明者　ガーディナー，　エリザベス
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２１２６，　サンディエゴ，　エージアン　コート　７５２９
(72)発明者　ラウ，　チン　ファン
中華人民共和国　香港，　ニュー　テリトリーズ，　シャーティン，　チャン　シェク　エステイト，　シェク　チン　ハウス，　ルーム　１９１３
(72)発明者　ロー，　ウィン－セー
中華人民共和国　香港，　チャイ　ワン，　シュウ　サイ　ワン　エステイト，　シュウ　ミン　ハウス，　ルーム　８１５
(72)発明者　グリーブ，　ジェフェリー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４７０８，　バークレー，　パーク　ヒルズ　ロード　１０６６
(72)発明者　アシュロック，　メリッサ
アメリカ合衆国　ニューハンプシャー　０３０５７，　マウント　バーノン，　ケンドール　ヒル　ロード　６５
(72)発明者　メンドレイン，　ジョン　ディー.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２０２４，　エンシニタス，　ネプチューン　アベニュー　１５５０

Ｆターム(参考)　4B050 CC03 CC07 DD11 LL01
4C076 AA11 BB11 CC06 CC07 DD23 DD26Z DD38 DD43Z DD51 DD56S DD60Z DD67 EE23F FF15 FF16 FF43 FF51 FF61
4C084 AA02 AA03 BA01 BA08 BA09 BA22 CA53 DC28 NA14 ZB08 ZB11 ZC19
4C085 AA03 BB22 CC21 DD62 EE01 GG01

专利名称(译)	组氨酰tRNA合成酶用于治疗自身免疫性和炎症性疾病		
公开(公告)号	JP2017222665A	公开(公告)日	2017-12-21
申请号	JP2017127737	申请日	2017-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	彭生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	Etaia制药公司 彭生物制药有限公司		
[标]发明人	チャンカイルピー ガーディナーエリザベス ラウチンファン ローウィンセー グリーブジェフェリー アシュロックメリッサ メンドレインジョンディー		
发明人	チャン, カイル ピー. ガーディナー, エリザベス ラウ, チン ファン ロー, ウィン-セー グリーブ, ジェフェリー アシュロック, メリッサ メンドレイン, ジョン ディー.		
IPC分类号	A61K38/16 A61K9/107 A61K9/127 A61K38/43 A61K38/53 A61K39/00 A61K47/02 A61K47/04 A61K47/10 A61K47/12 A61K47/18 A61K47/20 A61K47/22 A61K47/26 A61K47/34 A61P9/10 A61P11/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 A61K38/04 G01N33/573 G01N33/53 C12N15/09 C12N9/00		
CPC分类号	A61K38/16 A61K38/17 A61K38/53 A61K48/005 A61P11/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P29/00 C12N9/93 C12Y601/01021 G01N33/573 G01N2333/9015 G01N2800/52 Y02A50/473 A61K39/0008 A61K48/00 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	A61K38/16.ZNA A61K9/107 A61K9/127 A61K38/43 A61K38/53 A61K39/00.D A61K39/00.H A61K47/02 A61K47/04 A61K47/10 A61K47/12 A61K47/18 A61K47/20 A61K47/22 A61K47/26 A61K47/34 A61P9/10 A61P11/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00.111 A61K38/04 G01N33/573.A G01N33/53.N C12N15/00.A C12N9/00 A61K38/43.ZNA A61K48/00		
F-TERM分类号	4B050/CC03 4B050/CC07 4B050/DD11 4B050/LL01 4C076/AA11 4C076/BB11 4C076/CC06 4C076/CC07 4C076/DD23 4C076/DD26Z 4C076/DD38 4C076/DD43Z 4C076/DD51 4C076/DD56S 4C076/DD60Z 4C076/DD67 4C076/EE23F 4C076/FF15 4C076/FF16 4C076/FF43 4C076/FF51 4C076/FF61 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA09 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DC28 4C084/NA14 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZC19 4C085/AA03 4C085/BB22 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十岚弘		
优先权	61/599802 2012-02-16 US 61/655358 2012-06-04 US		

	61/725414 2012-11-12 US
其他公开文献	JP6330088B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：提供一种包含组氨酰-tRNA合成酶多肽或其他特异性封闭剂的组合物和方法，用于治疗自体免疫疾病和其它炎性疾病，包括与Jo-1抗体有关的炎性疾病。 该基因编码具有与特定氨基酸序列90％或更多相同的长度为500至506个氨基酸的组氨酰-tRNA合成酶（HRS）多肽，并缺少其他氨基酸序列的残基507至509包含修饰的mRNA多核苷酸的组合物基本上不含内毒素的组合物。

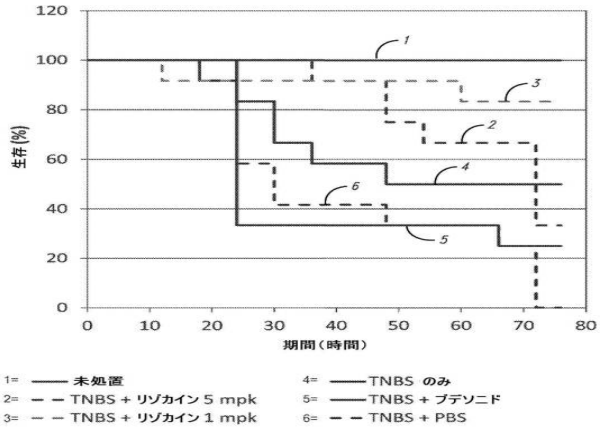


FIG. 1