

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6170077号
(P6170077)

(45) 発行日 平成29年7月26日 (2017. 7. 26)

(24) 登録日 平成29年7月7日 (2017. 7. 7)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/43 (2006. 01)	A 6 1 K 38/43 Z N A
C 1 2 Q 1/25 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/25
A 6 1 K 47/26 (2006. 01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K 47/10 (2006. 01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 K 47/18 (2006. 01)	A 6 1 K 47/18

請求項の数 30 (全 239 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-557848 (P2014-557848)	(73) 特許権者	512264080
(86) (22) 出願日	平成25年2月15日 (2013. 2. 15)		エータイアー ファーマ, インコーポレ
(65) 公表番号	特表2015-513534 (P2015-513534A)		イテッド
(43) 公表日	平成27年5月14日 (2015. 5. 14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/026494		21, サンディエゴ, ジョン ホブキ
(87) 国際公開番号	W02013/123432		ンス コート 3545, スイート ナ
(87) 国際公開日	平成25年8月22日 (2013. 8. 22)		ンバー250
審査請求日	平成28年1月29日 (2016. 1. 29)	(73) 特許権者	511225594
(31) 優先権主張番号	61/599, 802		パング バイオファーマ リミテッド
(32) 優先日	平成24年2月16日 (2012. 2. 16)		中華人民共和国 香港 クイーンズ ロー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ド セントラル 15, ザ ランドマー
(31) 優先権主張番号	61/655, 358		ク, エジンバラ タワー, 18/エフ
(32) 優先日	平成24年6月4日 (2012. 6. 4)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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) 【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 95 % 純粋であり、
 - b) 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 に記載の治療用組成物。

【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 に記載の治療用組成物。

【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 に記載の治療用組成物。

【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 に記載の治療用組成物。

【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 に記載の治療用組成物

。

【請求項 7】

前記 H R S 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 に記載の治療用組成物。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つのシステイン残基が、C y s 1 7 4、C y s 1 9 1、C y s 2 2 4、C y s 2 3 5、および C y s 4 5 5 から選択される、請求項 7 に記載の治療用組成物。

【請求項 9】

前記 H R S ポリペプチドが、4 ~ 4 0 °C、および 6 . 0 ~ 8 . 0 の p H の範囲の同等の条件下で、配列番号 1（全長 H R S）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 1 から 8 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

10

【請求項 1 0】

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1（全長 H R S）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 9 に記載の治療用組成物。

。

【請求項 1 1】

0 . 0 3 m M ~ 1 0 0 m M の範囲の濃度でヒスチジン緩衝剤を含み、前記 H R S ポリペプチドが、4 ~ 4 0 °C、および 7 . 0 ~ 7 . 5 の p H 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 H R S ポリペプチドと比べて、安定性が

20

【請求項 1 2】

2 0 m M ~ 5 0 m M の範囲の濃度でヒスチジン緩衝剤を含み、前記 H R S ポリペプチドが、4 ~ 4 0 °C、および 7 . 0 ~ 7 . 5 の p H 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 H R S ポリペプチドと比べて、安定性が増大している、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 1 3】

2 0 ~ 5 0 m M の L - ヒスチジン、1 4 0 ~ 1 5 0 m M の N a C l、0 . 0 2 % ~ 0 . 0 5 % のポリソルベート 2 0（P S 2 0）、必要に応じて 5 ~ 1 0 m M のメチオニンを含み、7 . 0 ~ 7 . 4 の p H を有する、請求項 1 から 1 0 のいずれかに記載の治療用組成物

30

。

【請求項 1 4】

2 0 ~ 5 0 m M の L - ヒスチジン、1 4 0 ~ 1 5 0 m M の N a C l、2 % のトレハロース、0 . 0 2 % ~ 0 . 0 5 % のポリソルベート 2 0（P S 2 0）、必要に応じて 5 ~ 1 0 m M のメチオニンを含み、7 . 0 ~ 7 . 4 の p H を有する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の治療用組成物。

【請求項 1 5】

2 0 ~ 5 0 m M の L - ヒスチジン、1 4 0 ~ 1 5 0 m M の N a C l、2 % のスクロース、0 . 0 2 % ~ 0 . 0 5 % のポリソルベート 2 0（P S 2 0）、必要に応じて 5 ~ 1 0 m M のメチオニンを含み、7 . 0 ~ 7 . 4 の p H を有する、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の治療用組成物。

40

【請求項 1 6】

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) ヒスチジルー t R N A 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 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の治療用組成物。

【請求項 1 7】

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

50

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 16 の (a) に記載の治療用組成物。

【請求項 18】

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 17 に記載の使用のための治療用組成物。

【請求項 19】

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 18 に記載の使用のための治療用組成物。

【請求項 20】

前記疾患が、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 16 の (d) に記載の治療用組成物。

【請求項 21】

請求項 1～10 のいずれか一項に定義される少なくとも 1 種のヒスチジル－tRNA 合成酵素 (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。

【請求項 22】

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 21 に記載の免疫吸着組成物。

【請求項 23】

前記生体適合性固体支持体が、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、ならびにアクリルアミド誘導体、メタクリルアミド誘導体およびポリスチレン誘導体を含めた合成マトリックスから選択される、請求項 21 または 22 に記載の免疫吸着組成物。

【請求項 24】

前記ポリマーが、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から選択される、請求項 23 に記載の免疫吸着組成物。

【請求項 25】

前記合成ポリマーが、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、およびこれらの混合物から選択される、請求項 23 に記載の免疫吸着組成物。

【請求項 26】

前記 HRS ポリペプチドが、前記生体適合性支持体に共有結合している、請求項 21～25 のいずれか一項に記載の免疫吸着剤組成物。

【請求項 27】

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、請求項 1～10 のいずれか一項に定義された少なくとも 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、それによって該固体支持体上に該抗 HRS 抗体を捕捉するステップと、を含む、方法。

【請求項 28】

前記抗 HRS 抗体が Jo-1 抗体を含む、請求項 27 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

細胞外体液から抗ヒスチジルー tRNA 合成酵素 (HRS) 抗体を体外免疫吸着させるための方法において使用するための、請求項 1～10 のいずれか一項に定義された HRS ポリペプチドを含む組成物であって、該方法が、

(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、該 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、ことを特徴とする、組成物。

【請求項 30】

HRS ポリペプチドの投与の直前に使用するための、請求項 29 に記載の組成物。

【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 日に提出された米国出願第 61/725,414 号、2012 年 6 月 4 日に提出された米国出願第 61/655,358 号および 2012 年 2 月 16 日に提出された米国出願第 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 258 KB 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ー 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ー 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ー 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ー 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、アミノアシルー 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

10

20

30

40

50

において、特に、ヒト tRNA 合成酵素について見つかった。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LEMENT (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 ELEMENT 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) などの全般的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 : 14

10

20

30

40

50

3～157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】

10

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、チャーグーストラウス症候群、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。

20

30

【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（asparaginyl）-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（Betttridgeら、Rheumat.、46巻、1005～1008頁、2007年）に対して向けられ

40

50

る抗K S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）。

10

【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。

20

30

【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

40

50

【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

10

20

30

40

50

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ー 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））。

10

【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ー 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。

20

30

【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。

40

【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J α -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

50

ド形成が低減されている。ある特定の実施形態では、H R S ポリペプチドは、配列番号 1（全長H R S）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、H R S ポリペプチドは、配列番号 1（全長H R S）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、H R S 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、H R S ポリペプチドは、配列番号 1（全長H R S）のポリペプチドと比べて、E . c o l i 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、H R S 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、H R S ポリペプチドは、少なくとも 1 種の D - アミノ酸を含む。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、治療用組成物は、約 0 . 03 mM ~ 約 100 mM 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 2 mM ~ 約 50 mM 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 40 mM ~ 約 60 mM 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 45 mM ~ 約 55 mM 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 50 mM 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。

20

【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、H R S ポリペプチドは、約 4 ~ 40 °C、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 H R S 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、H R S ポリペプチドは、約 4 ~ 40 °C、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 H R S ポリペプチドと比べて、安定性が増大している。

30

【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、H R S ポリペプチドは、約 4 ~ 40 °C、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 H R S 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 °C 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 °C（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 °C の温度を含む。

40

【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、H R S ポリペプチドの融解温度（T_m）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 H R S ポリペプチドのものより少なくとも約 5 °C 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、H R S 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 H R S 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】

50

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、A 3 4 0 での吸光度によって測定した場合、少なくとも約 1 0 % 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。

【0 0 3 7】

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、H R S ポリペプチドは、配列番号 1 の残基 1 ~ 5 0 6 または 2 ~ 5 0 6 と少なくとも 9 0 % 同一であり、配列番号 1 の残基 5 0 7 ~ 5 0 9 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

10

【0 0 3 8】

いくつかの実施形態では、組成物は、約 1 0 0 ~ 3 0 0 m M の範囲の濃度で、必要に応じて約 1 4 0 m M ~ 2 4 0 m M で、または必要に応じて、約 1 4 0 m M で塩化ナトリウム (N a C l) を含む。ある特定の実施形態では、H R S ポリペプチドは、配列番号 1 の残基 1 ~ 5 0 6 または 2 ~ 5 0 6 と少なくとも 9 0 % 同一であり、配列番号 1 の残基 5 0 7 ~ 5 0 9 を欠き、必要に応じて、少なくとも約 6 0 ° C の融解温度 (T m) を有する。ある特定の実施形態では、H R S ポリペプチドは、H R S (1 ~ 5 0 6) または H R S (2 ~ 5 0 6) であり、必要に応じて、少なくとも約 6 0 ° C の融解温度 (T m) を有する。

20

【0 0 3 9】

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。

30

【0 0 4 0】

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 2 0 (P S 2 0) 、ポリソルベート 4 0 (P S 4 0) 、ポリソルベート 6 0 (P S 6 0) 、またはポリソルベート 8 0 (P S 8 0) である。ある特定の実施形態では、ポリソルベートは、P S 2 0 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 F 6 8 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 . 0 5 % (w / v) の P S 2 0 である。

【0 0 4 1】

40

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 (N A C) 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 . 0 m M の濃度範囲で存在する。

【0 0 4 2】

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 (E D T A) 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 . 0 m M の濃度範囲で存在する。

【0 0 4 3】

50

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。

10

【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。

20

【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(T_m)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(T_m)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(T_m)を有する。

30

【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(T_m)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。

40

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

50

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、リボソーム、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ー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。

10

【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】

20

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、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。

30

【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。

40

【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

50

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でランケットされている。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。

10

【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。

20

【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でランケットされている。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

30

40

50

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、HR S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。

10

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) HR Sポリペプチド、b) 異種HR S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HR S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を低減する方法であって、a) HR Sポリペプチド、b) 異種HR S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HR S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。

20

【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) HR Sポリペプチド、b) 異種HR S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HR S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。

30

【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) HR Sポリペプチド、b) 異種HR S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HR S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) HR Sポリペプチド、b) 異種HR S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HR S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、HR S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。

40

【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) HR Sポリペプチド、b) 異種HR S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HR Sポリペプチドを発現する組換え宿主細胞の1種または

50

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細胞の機能的な不活化が引き起こされる、方法も含まれる。

10

【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。

20

【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ー 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

30

40

50

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。

10

【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ー 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。

20

【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J_o-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。

30

40

【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

50

）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。

10

【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。

20

【0088】

細胞外体液から抗ヒスチジール 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 種のヒスチジール 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。

30

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目 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ール 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。

（項目 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、項目 1 に記載の組成物。

40

（項目 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、項目 1 に記載の組成物。

（項目 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、項目 1 に記載の組成物。

（項目 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ール tRNA 合成酵素（HRS）ポリペプチドを

50

含む治療用組成物であって、該組成物／H R S ポリペプチドは、

a) 少なくとも約 9 5 % 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。

(項目 6)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 同一である 2 0 0 以上のアミノ酸を含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 7)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 同一である 4 0 0 以上のアミノ酸を含む、項目 5 に記載の組成物。

10

(項目 8)

前記 H R S ポリペプチドが、長さが少なくとも約 5 0 0 アミノ酸である、項目 5 に記載の組成物。

(項目 9)

前記 H R S ポリペプチドが、全長ヒト H R S (配列番号 1) の配列を含む、項目 5 に記載の組成物。

(項目 1 0)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 の残基 5 0 5 でトランケートされている (H R S (1 ~ 5 0 5)) かまたは配列番号 1 の残基 5 0 6 でトランケートされている (H R S (1 ~ 5 0 6))、項目 9 に記載の組成物。

20

(項目 1 1)

前記 H R S 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、項目 5 に記載の組成物。

(項目 1 2)

前記システイン残基が、C y s 1 7 4、C y s 1 9 1、C y s 2 2 4、C y s 2 3 5、C y s 4 5 5、C y s 5 0 7、および C y s 5 0 9 から選択される、項目 1 1 に記載の組成物。

(項目 1 3)

配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 同一である、長さが少なくとも約 4 0 0 アミノ酸のヒスチジル-t R N A 合成酵素 (H R S) ポリペプチドを含む治療用組成物であって、該組成物／H R S ポリペプチドは、

30

a) 少なくとも約 9 5 % 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。

(項目 1 4)

配列番号 1 と少なくとも 9 0 % 同一である、長さが少なくとも約 5 0 0 アミノ酸の H R S ポリペプチドを含む、項目 1 3 に記載の組成物。

(項目 1 5)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 (全長ヒト H R S) の配列を含む、項目 1 3 に記載の組成物。

40

(項目 1 6)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 の残基 5 0 5 でトランケートされている (H R S (1 ~ 5 0 5)) かまたは配列番号 1 の残基 5 0 6 でトランケートされている (H R S (1 ~ 5 0 6))、項目 1 3 に記載の組成物。

(項目 1 7)

前記 H R S 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、項目 1 3 に記載の組成物。

(項目 1 8)

前記システイン残基が、C y s 1 7 4、C y s 1 9 1、C y s 2 2 4、C y s 2 3 5、C y s 4 5 5、C y s 5 0 7、および C y s 5 0 9 から選択される、項目 1 7 に記載の組

50

成物。

(項目 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。

(項目 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、項目 19 に記載の組成物。

(項目 21)

前記 HRS ポリペプチドが、長さが 506 アミノ酸である、項目 19 に記載の組成物。

(項目 22)

前記 HRS ポリペプチドが、配列番号 70 を含む、項目 19 に記載の組成物。

(項目 23)

前記 HRS ポリペプチドが、配列番号 70 から本質的になる、項目 19 に記載の組成物

。

(項目 24)

前記 HRS ポリペプチドが、配列番号 70 からなる、項目 19 に記載の組成物。

(項目 25)

前記 HRS ポリペプチドが、長さが 505 アミノ酸である、項目 19 に記載の組成物。

(項目 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、項目 25 に記載の組成物。

(項目 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、項目 26 に記載の組成物。

(項目 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、項目 27 に記載の組成物。

(項目 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、項目 19 に記載の組成物。

(項目 30)

前記少なくとも 1 つのシステイン残基が、Cys 174、Cys 191、Cys 224、Cys 235、および Cys 455 から選択される、項目 29 に記載の組成物。

(項目 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、項目 19 から 30 のいずれかに記載の組成物

。

(項目 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、項目 31 に記載の組成物。

(項目 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、項目 31 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目 3 4)

活性の増大が、少なくとも約 1 0 % の非カノニカル生物活性の絶対的増大を含む、項目 3 1 から 3 3 のいずれかに記載の組成物。

(項目 3 5)

前記非カノニカル活性が、抗炎症活性、または抗 J o - 1 抗体への特異的結合である、項目 3 4 に記載の組成物。

(項目 3 6)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 (全長 H R S) 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、項目 3 1 から 3 3 のいずれかに記載の組成物。

10

(項目 3 7)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 (全長 H R S) 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、項目 3 1 から 3 3 のいずれかに記載の組成物。

(項目 3 8)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 (全長 H R S) 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、項目 3 1 から 3 3 のいずれかに記載の組成物。

(項目 3 9)

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 H R S ポリペプチドの単分散の少なくとも 1 0 % の増大を含む、項目 3 1 から 3 3 のいずれかに記載の組成物。

20

(項目 4 0)

前記 H R S ポリペプチドが、配列番号 1 (全長 H R S) の前記ポリペプチドと比べて、E . c o l i 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、項目 1 9 から 3 9 のいずれかに記載の組成物。

(項目 4 1)

前記 H R S 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、項目 1 から 4 0 のいずれかに記載の組成物。

(項目 4 2)

前記 H R S ポリペプチドが、少なくとも 1 つの D - アミノ酸を含む、項目 1 から 4 0 のいずれかに記載の組成物。

30

(項目 4 3)

約 0 . 0 3 m M ~ 約 1 0 0 m M の範囲の濃度で緩衝剤を含む、項目 1 から 4 2 のいずれかに記載の組成物。

(項目 4 4)

約 2 m M ~ 約 5 0 m M の範囲の濃度で緩衝剤を含む、項目 4 3 に記載の組成物。

(項目 4 5)

約 4 0 m M ~ 約 6 0 m M の範囲の濃度で緩衝剤を含む、項目 4 3 に記載の組成物。

(項目 4 6)

約 4 5 m M ~ 約 5 5 m M の範囲の濃度で緩衝剤を含む、項目 4 3 に記載の組成物。

(項目 4 7)

約 5 0 m M の濃度で緩衝剤を含む、項目 4 3 に記載の組成物。

40

(項目 4 8)

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、項目 4 3 から 4 7 のいずれかに記載の組成物。

(項目 4 9)

前記緩衝剤がヒスチジン緩衝剤であり、前記 H R S ポリペプチドが、約 4 ~ 4 0 ° C、および約 7 . 0 ~ 7 . 5 の p H 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 H R S ポリペプチドと比べて、安定性が増大している、項目 4 8 に記載の組成物。

(項目 5 0)

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、項目48に記載の組成物。

(項目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、項目48に記載の組成物。

(項目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、項目49から51のいずれかに記載の組成物。

(項目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、項目49から51のいずれかに記載の組成物。

(項目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、項目49から51のいずれかに記載の組成物。

(項目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(T_m)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、項目49から54のいずれかに記載の組成物。

(項目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、項目49から54のいずれかに記載の組成物。

(項目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、項目49から56のいずれかに記載の組成物。

(項目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、項目57に記載の組成物。

(項目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、項目49から58のいずれかに記載の組成物。

(項目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、項目55から59のいずれかに記載の組成物。

(項目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、項目55から59のいずれかに記載の組成物。

(項目62)

前記HRSポリペプチドが、HRS(1～506)またはHRS(2～506)である、項目60または61に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目 6 3)

約 1 0 0 ～ 3 0 0 mM の範囲の濃度で、必要に応じて約 1 4 0 mM で、塩化ナトリウム (NaCl) を含む、項目 1 から 6 2 のいずれかに記載の組成物。

(項目 6 4)

前記 HRS ポリペプチドが、配列番号 1 の残基 1 ～ 5 0 6 または 2 ～ 5 0 6 と少なくとも 9 0 % 同一であり、配列番号 1 の残基 5 0 7 ～ 5 0 9 を欠き、必要に応じて、少なくとも約 6 0 °C の融解温度 (Tm) を有する、項目 6 3 に記載の組成物。

(項目 6 5)

前記 HRS ポリペプチドが、HRS (1 ～ 5 0 6) または HRS (2 ～ 5 0 6) であり、必要に応じて、少なくとも約 6 0 °C の融解温度 (Tm) を有する、項目 6 4 に記載の組成物。

10

(項目 6 6)

1 種または複数種の薬学的に許容される賦形剤を含む、項目 1 から 6 5 のいずれかに記載の組成物。

(項目 6 7)

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、項目 6 6 に記載の組成物。

(項目 6 8)

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、項目 6 6 または 6 7 に記載の組成物。

20

(項目 6 9)

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、項目 6 8 に記載の組成物。

(項目 7 0)

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、項目 6 8 に記載の組成物。

(項目 7 1)

1 種または複数種の界面活性剤を含む、項目 1 から 7 0 のいずれかに記載の組成物。

(項目 7 2)

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、項目 7 1 に記載の組成物。

30

(項目 7 3)

前記ポリソルベートが、ポリソルベート 2 0 (PS 2 0)、ポリソルベート 4 0 (PS 4 0)、ポリソルベート 6 0 (PS 6 0)、またはポリソルベート 8 0 (PS 8 0) である、項目 7 2 に記載の組成物。

(項目 7 4)

前記ポリソルベートが PS 2 0 である、項目 7 3 に記載の組成物。

(項目 7 5)

前記ポロキサマーがプルロニック F 6 8 である、項目 7 2 に記載の組成物。

40

(項目 7 6)

前記界面活性剤が、約 0. 1 ～ 5. 0 % (w/v) の範囲で存在する、項目 7 1 から 7 4 のいずれかに記載の組成物。

(項目 7 7)

前記界面活性剤が、約 0. 0 5 % (w/v) の PS 2 0 である、項目 7 6 に記載の組成物。

(項目 7 8)

抗酸化化合物を含む、項目 1 から 7 4 のいずれかに記載の組成物。

(項目 7 9)

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 (NA

50

C) から選択される、項目 78 に記載の組成物。

(項目 80)

前記抗酸化化合物が、約 0.1 ~ 5.0 mM の濃度範囲で存在する、項目 78 または 79 に記載の組成物。

(項目 81)

キレート化剤を含む、項目 1 から 80 のいずれかに記載の組成物。

(項目 82)

前記キレート化剤がエチレンジアミンテトラアセレート (EDTA) である、項目 81 に記載の組成物。

(項目 83)

前記キレート化剤が、約 0.1 ~ 2.0 mM の濃度範囲で存在する、項目 81 または 82 に記載の組成物。

(項目 84)

前記 HRS ポリペプチドが、少なくとも約 10 mg/ml の濃度で存在する、項目 1 から 83 のいずれかに記載の組成物。

(項目 85)

前記 HRS ポリペプチドが、少なくとも約 25 mg/ml の濃度で存在する、項目 1 から 83 のいずれかに記載の組成物。

(項目 86)

前記 HRS ポリペプチドが、少なくとも約 50 mg/ml の濃度で存在する、項目 1 から 83 のいずれかに記載の組成物。

(項目 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、項目 1 から 86 のいずれかに記載の組成物。

(項目 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、項目 87 に記載の組成物。

(項目 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、項目 87 に記載の組成物。

(項目 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、項目 87 に記載の組成物。

(項目 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、項目 1 から 86 のいずれかに記載の組成物。

(項目 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、項目 91 に記載の組成物。

(項目 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、項目 91 に記載の組成物。

(項目 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、項目 91 に記載の組成物。

(項目 95)

約 3% 未満の高分子量凝集体を有する、項目 1 から 94 のいずれかに記載の組成物。

(項目 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、項目 95 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(項目 9 7)

高分子量 (H M W) 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、項目 9 5 に記載の組成物。

(項目 9 8)

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、項目 9 5 に記載の組成物。

(項目 9 9)

前記 H R S ポリペプチドが、少なくとも約 5 0 °C の前記組成物中での融解温度 (T m) を有する、項目 1 から 9 8 のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 0 0)

前記 H R S ポリペプチドが、少なくとも約 5 5 °C の前記組成物中での融解温度 (T m) を有する、項目 9 9 に記載の組成物。

(項目 1 0 1)

前記 H R S ポリペプチドが、少なくとも約 6 0 °C の前記組成物中での融解温度 (T m) を有する、項目 1 0 0 に記載の組成物。

(項目 1 0 2)

前記 H R S ポリペプチドが、少なくとも約 9 0 % 単分散である、項目 1 ~ 1 0 1 のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 0 3)

約 5 0 m M の L - ヒスチジン、約 1 4 0 m M の N a C l、約 2 % のトレハロース、約 0 . 0 5 % のポリソルベート 2 0 (P S 2 0) を含み、約 7 . 0 ~ 7 . 4 の p H を有する、項目 1 ~ 1 0 2 のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 0 4)

約 5 0 m M の L - ヒスチジン、約 1 4 0 m M の N a C l、約 2 % のスクロース、約 0 . 0 5 % のポリソルベート 2 0 (P S 2 0) を含み、約 7 . 0 ~ 7 . 4 の p H を有する、項目 1 ~ 1 0 2 のいずれかに記載の組成物。

(項目 1 0 5)

前記 H R S ポリペプチドが、H R S (1 ~ 5 0 6) または H R S (2 ~ 5 0 6) であり、少なくとも約 6 0 °C の前記組成物中での融解温度 (T m) を有する、項目 1 0 3 または 1 0 4 に記載の組成物。

(項目 1 0 6)

A 3 4 0 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 . 0 5 未満の濁度を有する、項目 1 0 5 に記載の組成物。

(項目 1 0 7)

A 5 8 0 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 . 0 5 未満の不透明度を有する、項目 1 0 5 に記載の組成物。

(項目 1 0 8)

約 2 % 未満または約 1 % 未満の高分子量凝集体を有する、項目 1 0 5 に記載の組成物。

(項目 1 0 9)

ヒスチジルー t R N A 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 H R S ポリペプチドを含み、該 H R S ポリペプチドは、該ヒスチジルー t R N A 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。

(項目 1 1 0)

前記 H R S ポリペプチドが、最大約 5×10^{-7} M の濃度まで、競合性 E L I S A においてヒスチジルー t R N A 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、項目 1 0 9 に記載の治療用組成物。

(項目 1 1 1)

ヒスチジルー t R N A 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 H R S ポリペプチドを含み、該 H R

10

20

30

40

50

S 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 H R S 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。

(項目 1 1 2)

ヒスチジルー t R N A 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 H R S ポリペプチドをコードする組換え核酸を含み、該 H R S 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。

(項目 1 1 3)

ヒスチジルー t R N A 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 H R S ポリペプチドを発現し、該核酸は、該宿主細胞内で該 H R S 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。

(項目 1 1 4)

ヒスチジルー t R N A 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、天然ヒスチジルー t R N A 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。

(項目 1 1 5)

少なくとも 1 種の H R S 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 H R S 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。

(項目 1 1 6)

少なくとも 1 種の H R S 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 H R S 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。

(項目 1 1 7)

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、項目 1 1 6 に記載の治療用組成物。

(項目 1 1 8)

少なくとも 1 種の H R S 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 H R S 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。

(項目 1 1 9)

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ー t R N A 合成酵素 (H R S) ポリペプチドの使用。

(項目 1 2 0)

前記治療用組成物または H R S ポリペプチドが、項目 1 から 1 0 8 のいずれかのように定義されている、項目 1 0 9 ~ 1 1 8 のいずれかに記載の治療用組成物または項目 1 1 9 に記載の使用。

(項目 1 2 1)

前記 H R S ポリペプチドが、長さが約 1 0 ~ 約 6 0 アミノ酸である、項目 1 0 9 ~ 1 1 8 のいずれかに記載の治療用組成物または項目 1 1 9 に記載の使用。

(項目 1 2 2)

前記 H R S ポリペプチドが、長さが約 6 0 ~ 約 8 0 アミノ酸である、項目 1 0 9 ~ 1 1 8 のいずれかに記載の治療用組成物または項目 1 1 9 に記載の使用。

(項目 1 2 3)

前記HRSポリペプチドが、長さが約80～約200アミノ酸である、項目109～118のいずれかに記載の治療用組成物または項目119に記載の使用。

(項目 1 2 4)

前記HRSポリペプチドが全長である、項目109～118のいずれかに記載の治療用組成物または項目119に記載の使用。

(項目 1 2 5)

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、項目109～118のいずれかに記載の治療用組成物または項目119に記載の使用。

10

(項目 1 2 6)

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、項目109～118のいずれかに記載の治療用組成物または項目119に記載の使用。

(項目 1 2 7)

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、項目126に記載の治療用組成物。

(項目 1 2 8)

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、前記項目のいずれかに記載の治療用組成物または使用。

20

(項目 1 2 9)

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、前記項目のいずれかに記載の治療用組成物または使用。

(項目 1 3 0)

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、前記項目のいずれかに記載の治療用組成物または使用。

30

(項目 1 3 1)

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、前記項目のいずれかに記載の治療用組成物または使用。

(項目 1 3 2)

前記異種タンパク質がT細胞リガンドを含む、項目131に記載の治療用組成物または使用。

(項目 1 3 3)

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。

40

(項目 1 3 4)

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、項目133に記載の方法。

(項目 1 3 5)

前記自己抗体が、ヒトヒスチジルー tRNA合成酵素に特異的である、項目133または134に記載の方法。

50

(項目 1 3 6)

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ー tRNA合成酵素の少なくとも1種のエピトープを含む、項目135に記載の方法。

(項目 1 3 7)

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ー tRNA合成酵素への結合を遮断する、項目136に記載の方法。

(項目 1 3 8)

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、項目133に記載の方法。

(項目 1 3 9)

前記HRSポリペプチドが、自己免疫応答に関与するT細胞の機能的な不活化を引き起こす、項目133に記載の方法。

(項目 1 4 0)

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、項目133に記載の方法。

(項目 1 4 1)

前記HRSポリペプチドが、寛容を誘導する、項目133に記載の方法。

(項目 1 4 2)

前記HRSポリペプチドが、長さが約10～約60アミノ酸である、項目133から141のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 3)

前記HRSポリペプチドが、長さが約40～約80アミノ酸である、項目133から141のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 4)

前記HRSポリペプチドが、長さが約80～約200アミノ酸である、項目133から141のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 5)

前記HRSポリペプチドが全長である、項目133から141のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 6)

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、項目133から141のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 7)

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、項目133から141のいずれかに記載の方法。

(項目 1 4 8)

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、項目147に記載の方法。

(項目 1 4 9)

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、項目133から148のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 0)

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、項目133から149のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 1)

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

10

20

30

40

50

b) 表 D 1、D 3～D 6、もしくは D 8 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、項目 1 3 3 から 1 5 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 2)

前記 H R S ポリペプチドが、異種タンパク質に融合されている、項目 1 3 3 から 1 5 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 3)

前記異種タンパク質が T 細胞リガンドを含む、項目 1 5 2 に記載の方法。

(項目 1 5 4)

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、項目 1 3 3 から 1 5 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 5)

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、項目 1 3 3 から 1 5 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 6)

前記 H R S 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、項目 1 3 3 から 1 5 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 7)

前記 H R S ポリペプチドが、ヒト組織適合性複合体（MHC）クラス I I 分子に結合する、項目 1 3 3 から 1 5 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 1 5 8)

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、項目 1 3 3 に記載の方法。

(項目 1 5 9)

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、項目 1 3 3 に記載の方法。

(項目 1 6 0)

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) H R S ポリペプチド、

b) 異種 H R S 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 H R S 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。

(項目 1 6 1)

前記組織が、筋肉、肺、および皮膚から選択される、項目 1 6 0 に記載の方法。

(項目 1 6 2)

筋肉炎症または肺炎症を低減する方法であって、

a) H R S ポリペプチド、

b) 異種 H R S 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 H R S 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。

(項目 1 6 3)

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) H R S ポリペプチド、

b) 異種 H R S 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 H R S 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。

(項目 1 6 4)

10

20

30

40

50

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、項目163に記載の方法。

。(項目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。

。(項目166)

ヒスチジルー 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。

。(項目167)

ヒスチジルー 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。

。(項目168)

ヒスチジルー 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細胞の機能的な不活化が引き起こされる、方法。

。(項目169)

ヒスチジルー 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、ヒスチジルー tRNA 合成酵素不足を機能的に補償する、補充療法。

。(項目170)

10

20

30

40

50

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。

(項目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ー 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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目175)

前記HRSポリペプチドが全長である、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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、項目179に記載の方法。

(項目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、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目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。

(項目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

10

20

30

40

50

性を判定するステップとを含む、方法。

(項目 184)

ヒスチジルー 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ー 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。

(項目 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ー 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ー 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。

(項目 186)

前記被験体の血清中のヒスチジルー 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、項目 185 に記載の方法。

(項目 187)

前記被験体の血清中のヒスチジルー 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、項目 185 に記載の方法。

(項目 188)

細胞外体液から抗ヒスチジルー 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 種のヒスチジルー 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。

(項目 189)

前記抗 HRS 抗体が J o - 1 抗体を含む、項目 188 に記載の方法。

(項目 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ー 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) 野生型ヒスチジルー tRNA 合成酵素と比較して該抗ヒスチジルー 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。

(項目 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ー 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、ヒスチジルー 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。

(項目 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ー 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、ヒスチジルー 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。

【図面の簡単な説明】

10

【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) ($\text{HisRS}^{\text{N}4}$ ；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。

20

【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 ($\text{HisRS}^{\text{N}4}$ ；HRS (1~60)) と抗Jo-1抗体含有血清との競合を示す。データは、全長ヒスチジルー 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。

30

【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、 $\text{HisRS}^{\text{N}8}$ (HRS (1~506)) と抗Jo-1抗体含有血清との競合を示す。データは、 $\text{HisRS}^{\text{N}8}$ 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】

40

【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 $\text{HisRS}^{\text{N}4}$ (HRS (1~60)) のいずれかをを用いた、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 $\text{HisRS}^{\text{N}4}$ 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スプライスバリエントおよび他の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 (HisR

50

S^N 4 ; S V 9 ; または H R S (1 ~ 6 0)) または W H E P ドメインを欠く欠失 H i s R S (配列番号 1 のアミノ酸 5 4 ~ 5 0 6 を含む) (d W H E P) 構築物との結合に関する広範な J o - 1 陽性抗体試料の抗体選択性を表示する。

【 0 0 9 7 】

【図 9】図 9 は、全長 H R S および H R S (1 ~ 5 0 6) を用いた免疫枯渇試験の結果を示す。結果は、全長 H A R S および H R S (1 ~ 5 0 6) の両方が、ヒト血清試料からの J o - 1 抗体の免疫枯渇において有効であったことを示し、H R S (1 ~ 5 0 6) が、検出可能な J o - 1 抗体の最大 9 9 % を除去することができたことを示す。

【 0 0 9 8 】

【図 1 0 A】図 1 0 A は、スタチン誘導性筋炎のラットモデルにおける H R S (1 ~ 5 0 6) (または A T Y R 1 9 4 0) の効果の評価に使用した投薬戦略の図表を示す。

10

【図 1 0 B】図 1 0 B 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 H R S (1 ~ 5 0 6) の効果を示す。

【 0 0 9 9 】

【図 1 1 A】図 1 1 A ~ 図 1 1 B は、スタチン誘導性筋炎のラットモデルにおける、C K レベルにおける H R S (1 ~ 5 0 6) の効果を示す。

【図 1 1 B】図 1 1 A ~ 図 1 1 B は、スタチン誘導性筋炎のラットモデルにおける、C K レベルにおける H R S (1 ~ 5 0 6) の効果を示す。

【 0 1 0 0 】

【図 1 2】図 1 2 は、内在性血清 H R S 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 H R S 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。

20

【 0 1 0 1 】

【図 1 3】図 1 3 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 . 3 m g / k g H R S (1 ~ 5 0 6) 処置ラットと比べた、1 m g / k g および 3 m g / k g H R S (1 ~ 5 0 6) 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。

【 0 1 0 2 】

【図 1 4】図 1 4 は、増加量の H R S (1 ~ 5 0 6) 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 R N A 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 1 3 遺伝子が、H R S (1 ~ 5 0 6) 処置により低下したことを実証した。

30

【 0 1 0 3 】

【図 1 5 A】図 1 5 A 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 R N A プロファイリングの結果を示す。

【図 1 5 B】図 1 5 B は、H R S (1 ~ 5 0 6) で処置したスタチン誘導ラットの結果を示す。

【 0 1 0 4 】

【図 1 6】図 1 6 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、1 0 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、H R S (1 ~ 5 0 6) 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。

40

【 0 1 0 5 】

【図 1 7】図 1 7 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、H R S (1 ~ 5 0 6) 処置により低下したことを明らかにした。

【 0 1 0 6 】

【図 1 8 A】図 1 8 A ~ 図 1 8 D は、H R S (1 ~ 5 0 6) 処置が、免疫細胞マーカー遺伝子 I T G A L (C D 1 1 a) (図 1 8 A) 、C D 1 1 b (図 1 8 B) 、C D 8 a (図 1 8 C) 、C D 8 b (図 1 8 D) の発現を低下させたことを示す。

50

【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18C）、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】

10

【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】

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、MMP3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。

10

【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。

20

【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、mHRSで免疫化したSJL/Jマウスが、全長HRS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、HRS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。

30

【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、mHRSで免疫化したSJL/Jマウスが、全長HRS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、HRS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。

40

【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。

50

【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「エネルギー」は、抗原による再刺激に対するT細胞またはB細胞応答の機能的な

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ε-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。

10

【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。

20

【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 mellitus))；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(cryoglobulinemia)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

30

40

50

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效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、他の有害な生理的效果の中でも、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

リングまたはバイアルなどに基づく、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、カプ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、カプ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目指す。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「コンフォメーション」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、タンパク質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)コンテキ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「EC₅₀」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、これがいづ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EC₅₀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。EC₅₀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、「EC₉₀」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。「EC₉₀」は、「EC₅₀」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EC₅₀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500 nM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1 nM以下のEC₅₀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

10

20

30

40

50

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キストでの、もしくは細胞外環境のコンテキ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(arraA)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);TRE_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エーション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。

10

【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。

20

【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。

30

【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

40

50

． 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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、ヒスチジルー 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。

10

【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。

20

【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。

30

【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 Pharma

40

50

ceutical 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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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】

ヒスチジルー 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細胞の機能的な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、ヒスチジルー tRNA 合成酵素「自己抗原活性化T細胞」および／またはヒスチジルー 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

10

20

30

40

50

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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー tRNA合成酵素不足は、内因性ヒスチジルー tRNA合成酵素中の変異によって引き起こされ、これは、内因性ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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ー 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、ヒスチジルー 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「ヒスチジルー tRNA合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患」は、ヒスチジルー 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、抗体がヒスチジルー tRNA合成酵素の様々なスプライスバリエント、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。ヒスチジルー 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、J o - 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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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。

10

【0179】

いくつかの実施形態では、HRS ポリペプチドは、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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】

20

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、ヒスチジルー 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ー 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ー 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ー 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。

30

【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、野生型ヒスチジルー 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、ヒスチジルー tRNA 合成酵素に対する自己抗体は、J o - 1 抗原に向けられている。

40

【0183】

ヒスチジルー tRNA 合成酵素に特異的な自己抗体に関連した疾患（およびヒスチジルー 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

50

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、ヒスチジルー t R N A 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ー t R N A 合成酵素の不足をもたらす遺伝子障害がある。ヒスチジルー t R N A 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ー t R N A 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、ヒスチジルー t R N A 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) ヒスチジルー t R N A 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、抗ヒスチジルー t R N A 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ー t R N A 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。

10

【0185】

さらに、本発明の H R S ポリペプチドを投与すると、ヒスチジルー t R N A 合成酵素の濃度を回復することによって (抗ヒスチジルー t R N A 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】

20

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) H R S ポリペプチド、i i) 異種 H R S ポリペプチドをコードする組換え核酸、または i i i) 少なくとも 1 種の異種 H R S 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 (I B M) を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、i) H R S ポリペプチド、i i) 異種 H R S ポリペプチドをコードする組換え核酸、または i i i) 少なくとも 1 種の異種 H R S 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。

30

【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) H R S ポリペプチド、i i) 異種 H R S ポリペプチドをコードする組換え核酸、または i i i) 少なくとも 1 種の異種 H R S 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) H R S ポリペプチド、i i) 異種 H R S ポリペプチドをコードする組換え核酸、または i i i) 少なくとも 1 種の異種 H R S 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。

40

【0190】

いくつかの実施形態は、間質性肺疾患 (I L D) を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、i) H R S ポリペプチド、i i) 異種 H R S ポリペプチドをコードする組換え核酸、または i i i) 少なくとも 1 種の異種 H R S 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) H R S ポリペプチド、i i) 異種 H R S ポリペプチドをコードする組換え核酸、または i i i) 少なくとも 1 種の異種 H R S ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞

50

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（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

10

20

30

40

50

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ます、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せられたとき、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

10

20

30

40

50

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H₂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。

10

【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の上昇と組み合わせられることが多い。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。

20

【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氣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。

30

【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。

40

【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】

50

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）。

10

【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、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。

20

【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、法的に盲目である。

30

【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

40

50

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（mitochondrial）ヒスチジール-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

10

20

30

40

50

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

10

【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エーションであり、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のものと同様に匹敵し得るが、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）およびうつ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。

20

【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過し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。

30

【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。

40

【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】

50

肢帯型筋ジストロフィー 2 B 型 (L G M D 2 B) 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。L G M D 2 B 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／炎症性病変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 (H L A - D R、H L A - A B C、C D 8 6)、C D 8 ⁺ 細胞毒性 T 細胞、および C D 4 ⁺ T 細胞から主になる顕著な炎症細胞浸潤を示す。

【0230】

10

成人発症の L G M D 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。L G M D 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 (F S H) : F S H は、L a n d o u z y - D e j e r i n e 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る。F S H 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。

20

【0231】

F S H 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 (f a c i o -)、肩 (s c a p u l o -)、および上腕 (h u m e r a l) 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。F S H 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 F S H D に必要であり、第 1 は、D 4 Z 4 リピートの欠失であり、第 2 は、D U X 4 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、肩甲骨のウィングングと呼ばれる。

30

【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 (D M 1) 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、D M P K (筋緊張性ジストロフィープロテインキナーゼ) 遺伝子の D N A 配列中の短い (C T G) 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 (D M 2) は、はるかにまれであり、Z N F 9 (亜鉛フィンガータンパク質 9) 遺伝子中の C C T G リピートの拡張の結果である。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【0238】

先天型筋ジストロフィー（CMD）：CMDは、出生から存在し、全般的な脱力をもち、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、「フロップネス（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。

30

【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。

40

【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。

50

【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-HT₃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、プロゲステゲン(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-HT₃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、腎不全をもたらす得る。

【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VII、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（Kupffer 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す得る。

10

【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、肺炎、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。

20

【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。

30

【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、 $\gamma\delta$ T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。

40

【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

50

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（gastroesophageal 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（epidymis）、前立腺、精嚢、精巣）、筋骨格系（例えば、骨格筋、平滑筋、骨、軟骨、腱、靱帯）、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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（*encephalomyelitis*）（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（*sensorineural 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

40

50

ナム舞蹈病 (Sydeham chorea)、ジルドラトウレット症候群、自己免疫性多腺性内分泌障害、ディスイミュンニューロパシー (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、K1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（*Haemophilus*）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、冷氣誘導性喘息、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 (bronchiolitis)、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

【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、Th1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 Jo

10

20

30

40

50

urnal 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、

10

20

30

40

50

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V I I I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、チャージストラウス症候群、p a u c i - i m m u n e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、および血栓に関連した静脈炎（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游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（Olanzapine）、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、先天性トキソプラズマ症、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（cholecystitis）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（amitriptyline）、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（Hashimoto'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（pernicious 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、精囊、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）、フェルデングル（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

10

20

30

40

50

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- α 、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】

HRSP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】

HRSP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）、CIAS1関連疾患、例えば、マックルーウェルズ症候群、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】

HRSP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HRSP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/mm³（4×10⁹細胞/L）未満、もしくは12,000細胞/mm³（12×10⁹細胞/L）超の白血球数；または10%超の未成熟好中球（带状体）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 agalactiae*、*Escherichia coli*、*Haemophilus influenzae*、*Listeria monocytogenes*、コアグラゼ陰性ブドウ球菌、*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。

10

20

【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。

30

【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- α 、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OX40 I G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- α 遮断薬がある。したが

40

50

って、H R S 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、線維索性炎症、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H R S 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、感染エージェン特に対する応答、例えば、結核、ライ病、および梅毒から生じる。線維索性炎症は、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癒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】

H R S 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、引っ張られた靱帯、靱帯断裂、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】

H R S 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A A R S 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（N S A I D）、免疫選択的抗炎症誘導体（I m S A I D）、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H R S 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；Koziolék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Pro sorba（登録商標）、Immunosorba（登録商標）、およびKaneka、Wiesbaden、ドイツが販売するSele sorb（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灌流される。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ー 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。

10

【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切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。

20

【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J o - 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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【0309】

これらの体外方法および組成物のいずれにおいても、HR S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、HR S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 (Pharmacia-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 Interscience, 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、HR S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、HR S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romopropanol、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。

30

【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Sephacrose 4B (Amersham)、またはエポキシ活性化アガロース (Sigma) などがある。生体適合性スパーサーを含むもの（例えば、NHS-活性化Sephacrose 4 Fast Flowのような）、または含まないもの（例えば、CNBr-活性化Sephacrose 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HR S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。

40

【0311】

50

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J α -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】

ヒスチジルー 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ー 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。ヒスチジルー tRNA 合成酵素は、クラス I I 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 I I 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ー 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ー 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キストにおいて、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、ヒスチジルー 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、野生型ヒスチジルー 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】

10

20

30

【表 D 1 - 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/	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLR YDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVK VND RRILDGMFAICGVSDSKFR TICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVG EKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALE GLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLL QTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGL SIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGE QE LKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	1
全長ミトコン ドリア型野生型	タンパク質/ ヒト/	MPLLGLLPRRAWASLLS QLLRPPCASCTGAVRCQSQVAEAVL TSQLKAHQEKPNFIKTPKGTRDLS PQHMMVVREKILDLVISC FK RHGAKGMDTPAFELKETL TEKYGEDSGLMYDLKDQGGELLS LRYDLTVPFARYLAMNKVKKMKRYHVGKVWRRESPTIVQGR YREFCQCDFDIAGQFDP MIPDAECLKIMCEILSGLQLGDFLIK V NDRRIVDGMFAVCGVPESKFRAICSSIDKLDKMAWKDVRHE MVVKKGLAPEVADRIGDYVQCHGGVSLVEQMFQDPRLSQNK QALEGLGDLKLLFEYLT LFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYE AVLLQTPTQAGEEPLNVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGHKVP CVGLSIGVERIFYIVEQRMKTKGEKVRTTETQVFVATPQKNFL QERLKLIAELWDSGIKAEMLYKNNPKLLTQLHYCESTGIPLVV	39

10

20

【表 D 1 - 2】

HisRS1 ^{N1}	タンパク質/ ヒト/ 1-141	IIGEQELKEGVKIRSVASREEVAIKRENFVAEIQKRLSES MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLR YDLTVPFARYLAM	2
HisRS1 ^{N2}	タンパク質/ ヒト/ 1-408	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLR YDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVK VND RRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVG EKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALE GLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLL QTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGL SIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTE	3
HisRS1 ^{N3}	タンパク質/ ヒト/ 1-113	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKL	4
HisRS1 ^{N4} (リゾカイン; SV9; HRS(1-60))	タンパク質/ ヒト/ 1-60	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPK	5
HisRS1 ^{N5}	タンパク質/ ヒト/ 1-243 + 27aa	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELL SLR YDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYR EFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVK VND RRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVGYPWWNSCSRIL NYPKTSRPRAWET	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	RTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNP KLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVR REDLVEEIKRRTGQPLCIC	7
HisRS1 ^{C2}	タンパク質/ ヒト/ 1-60 + 175- 509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVK VNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDK VSWEEVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLL QDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARG LDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVG MFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQY CEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEI KRRTGQPLCIC	8
HisRS1 ^{C3}	タンパク質/ ヒト/ 1-60 + 211- 509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTIC SSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGG VSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISF DLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGR YDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRT TETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKL LNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRRE DLVEEIKRRTGQPLCIC	9
HisRS1 ^{C4}	タンパク質/ ヒト/ 1-100 + 211-509	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVD KLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLV EQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSL	10

10

20

30

40

【表 D 1 - 3】

		ARGLDYYTGVIIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC		
HisRS1 ^{C5}	タンパク質/ ヒト/ 1-174 + 211-509	MAERA ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLR YDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPMATRG RYR EFYQCVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE E VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKL SQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYT GVIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPK GRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQ KKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAG IPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPLCIC	11	10
HisRS1 ^{C6}	タンパク質/ ヒト/ 1-60 + 101- 509	MAERA ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGEL LSLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPMATRG RYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVK VNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE E VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKL SQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEE RLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	12	20
HisRS1 ^{C7}	タンパク質/ ヒト/ 1-100 + 175-509	MAERA ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQI GDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPK LSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLDYY TGVIIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDP KGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASA QKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEE A GIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPLCIC	13	30
HisRS1 ^{C8}	タンパク質/ ヒト/ 1-60 + 399- 509	MAERA ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEE RLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAI IGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	14	
HisRS1 ^{C9}	タンパク質/ ヒト/ 1-100 + 399-509	MAERA ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAE LIEEEVAKLLKLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGT RDYSPRQMAVREKVFDVIIRCFK RHGA EVIDTPVFELKALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLK LVSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGE Q ELKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTGQPLCIC	15	
HisRS1 ^{C10}	タンパク質/ ヒト/ 369-509	MFDPKGRKVP CVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQLQY CEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEE I KRRTGQPLCIC	16	40
内部フィオクリン				
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 ^{II}	タンパク質/ ヒト/ 191-333	CLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTI CSSVDKLDKVSWE E VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQH GGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDD KISFDLSLARGLDYYTG	17	

ヒト遺伝子のいくつかの天然に存在するヒスチジルー tRNA 合成酵素一塩基多型 (SNP) および天然に存在するバリエーションは、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。ヒスチジルー tRNA 合成酵素のいくつかのこのようなバリエーション (即ち、代表的なヒスチジルー tRNA 合成酵素 SNP) を表 D 2 に示す。

【0316】

【表 D 2 - 1】

表 D2 ヒトヒスチジルー 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

10

20

30

40

50

【表 D 2 - 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

10

20

30

40

【表 D 2 - 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

10

20

30

40

【表 D 2 - 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

10

【0317】

さらに、ヒト遺伝子のホモログおよびオルソログは、表 D 3 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 D 1、D 4 ~ D 6、または D 8 に列挙したヒト H R S ポリペプチド配列のいずれかの代わりに、S N P 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エーション、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 D 3 - 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
<i>Mus musculus</i>	MADRAALEELVRLQGAHVRLKEQKASAEQIEEEVTKLLKLKAQLGQDE GKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIMCEILS SLQIGNFLVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQAVEG LGDLKLLFEYLILFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQMPQTAGE EPLGVGSIAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAS EEKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYWEEAGIPLVAIIGEQLRDGVIKLRVASREEVDVRREDLVEEIRRR TNQPLSTC	18
<i>Canis lupus familiaris</i>	MAERAALLEELVRLQGERVRLKQKASAEQIEEEVAKLLKLKAQLGPDE GKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIISCFKRHGAVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLYDLTVPFARYLAMNKLTNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLEIMCEILR SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVPSKFTICSSVDKLDKVSWEVVK EMVGEKGLAPEVADHIGDYVQQHGGISLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTLFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPVQAGEEP LGVSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEATE EKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWNAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVILKRSVASREEVDVPREDLVEEIKRRT SQPFCIC	19
<i>Bos taurus</i>	MADRAALEDLVRVQGERVRLKQKASAEQIEEEVAKLLKLKAQLGPDE GKPKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIISCFKRHGAVIDTPVFELK ETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLYDLTVPFARYLAMNKLTNIKRY HIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMLPDAECLKIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVPSKFTICSSVDKLDKVSWEVVK EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTLFGIADKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQPPARAGEEP GVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEE KVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEETGIPLVAIIGEQLKDGVILKRSVASREEVDVR REDLVEEIKR RTSQPLCIC	20
<i>Rattus</i>	MADRAALEELVRLQGAHVRLKEQKASAEQIEEEVTKLLKLKAQLGHDE	21

10

20

30

【表 D 3 - 2】

<i>norvegicus</i>	GKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVIIRCFKRHGAVIDTPVFEL KETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTVPFARYLAMNKLTKIR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIMCEILS SLQIGNFQVKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRITCSSVDKLDKVSWEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQAVEG LGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVYIEAVLLQMPTQAGE EPLGVGSIAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQKLEAS EEKVRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLISELWDAGIKAEELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGI PLVAIIGEQE LKDGVIKLRSVTSREEVDVR REDLVEEIRR RTSQPLSM	
<i>Gallus gallus</i>	MADEAAVRQQAEEVVRRLKQDKAEPDEIAKEVAKLLEMKAHLGGDEGKH KFLVLTTPKGTRDYGPKQMAIRERVFSAIACFKRHGAVIDTPVFELKETL TGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTVPFARYLAMNKITNIKRYHIA KVVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQFDPMPDAECLKIVQEILSDLQ LGDFLIKVNDRRILDGMFAVCGVPDSKFRITCSSVDKLDKMPWEEVRNEM VGEKGLSPEAADRIGEEYVQLHGGMDLIEQLLQDPKLSQNKLVKEGLGDM KLLFEYLTFLGITGKISFDLSLARGLDYYTGVYIEAVLLQQNDHGEESVSV GSVAGGGRYDGLVGMFDPKGR KVPVGLSIGIERIFSILEQRVEASEEKIR TTETQVLVASAQKKLLEERLKLISELWDAGIKAEVLYKKNPKLLNQLQYC EDTGIPLVAIVGEQELKDGVVKLRRVATGEEVNIRRESLVEEIRRTNQL	22
<i>Danio rerio</i>	MAALGLVSMRLCAGLMGRRSAVRLHSLRVCSGMTISQIDEEVARLLQLK AQLGGDEGKHVFLKTAKGTRDYNPKQMAIREKVFNIINCCKRHGAETI DSPVFELKETLTGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTVPFARYLAMN KITNIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGQYDAMIPDAECL KLVYEILSELDLGFRIKVNDRRILDGMFAICGVPDEKFRITCSTVDKLDKL AWEEVKKEMVNEKGLSEEVADRIRDYVSMQGGKDLAERLLQDPKLSQS KQACAGITDMKLLFSYLELFQITDKVVFDSLARGLDYYTGVYIEAILTQA NPAPASTPAEQNGAEDAGVSVGAGGGRYDGLVGMFDPKAGKCPVWG SALALRGSSPSWSRRQSCLQRRCAPLKLKCLWLQHRRTF	23

10

20

【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、ヒスチジルー 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ー tRNA 合成酵素のすべての天然に存
 在する形態および合形成態を含む。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 D 1 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 D 2 ～ D 9 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エーション
 および他のバリエーションを含む。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ー tRNA 合成酵素（表 D 1 中の配列番
 号 1）に由来するポリペプチド配列を指す。

30

【0320】

いくつかの実施形態では、HRS ポリペプチドは、最大約 $1 \sim 5 \times 10^{-7}$ M 以上の濃
 度まで、競合性 ELISA において野生型ヒスチジルー 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
 チドは、競合性 ELISA で測定した場合、野生型ヒスチジルー 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。

40

【0321】

修飾された HRS ポリペプチドおよびバリエーション HRS ポリペプチド

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

50

、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エーション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は異なるバリエーションとして存在し得、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エーションを含めた、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、鑄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. Biotechnol.、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2004/0008698号を参照；レトロインベルソー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エーション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、ヒスチジルー 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「バリエーション」を含む。ポリペプチド「バリエーション」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。バリエーションは、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。

10

【0325】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドバリエーションは、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、ポリペプチドバリエーションは、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が、当技術分野で十分に理解されている。

【0326】

20

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 ポリペプチドバリエーションの具体例としては、i) 検出可能な非カノニカル活性を保持し、かつ／またはヒスチジルー 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エーション（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、バリエーションポリペプチドは、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。

30

40

【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ー tRNA 合成酵素のポリ

50

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エーションである。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	MAERAALVELVVKLGGERVRGLKQKASAELEEVEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSPQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDL VEEIKR	160

【表 D 4 - 2】

HRS(1-501)	タンパク質/ ヒト/ 1-501	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRR	161	10
HRS(1-502)	タンパク質/ ヒト/ 1-502	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRT	162	20
HRS(1-503)	タンパク質/ ヒト/ 1-503	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTG	163	30
HRS(1-504)	タンパク質/ ヒト/ 1-504	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTG	164	40
HRS(1-505)	タンパク質/ ヒト/ 1-505	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD	165	

【表 D 4 - 3】

		YYTGVIIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQP	
HisRS1 ^{NS} HRS(1- 506)	タンパク質/ ヒト/ 1-506	MAERAALVELVKLQGERVRGLKQQKASAELEIEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPL	70
HRS(2- 506)	タンパク質/ ヒト/ 2-506	AERAALVELVKLQGERVRGLKQQKASAELEIEEVAKLLK AQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVIIR FKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGEL LSLRYDLTPVFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM RGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD LVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP LSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YTGVIIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM DPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL ASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL YCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPL	166
HRS(1- 507)	タンパク質/ ヒト/ 1-507	MAERAALVELVKLQGERVRGLKQQKASAELEIEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLC	167
HRS(1- 508)	タンパク質/ ヒト/ 1-508	MAERAALVELVKLQGERVRGLKQQKASAELEIEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKL TNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLT LFGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIIYEA VLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLCI	168

10

20

30

40

【表 D 4 - 4】

HRS(1-509)	タンパク質/ ヒト/ 1-509	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFVDVII RCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG ELLSLRYDLTPVFARYLAMNKLNIKRYHIAKVYRRDNPAM TRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEILSSLQIGD FLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE EVKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDP KLSQNKQALEGLGDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLD YYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGM FDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVL VASAQKKLLEERLKLVSSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQL QYCEEAGIPLVAIHGEQELKDGVIKLRSVTSREEVDVRREDL VEEIKRRTGQPLCIC	169
HisRS1 ^{N6} HRS(1-48)	タンパク質/ ヒト/ 1-48	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPD	71

10

【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パ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。

20

【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、比較のウィ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、比較のウィンドウにわたって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ィンドウ内の位置の総数（即ち、ウィンドウサイズ）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。

30

【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」、「比較ウィンドウ」、「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、「比較ウィンドウ」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。「比較ウィンドウ」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。比較ウィンドウは、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

40

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

40

【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

50

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。

10

【0338】

ある特定の実施形態では、バリエーションポリペプチドは、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、バリエーション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。

20

【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】

30

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

40

50

、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ランケートされている場合がある。ある特定の例示的なランケートされたHRSポリペプチドを以下の表D5に示す。

【0341】

【表D5-1】

表D5 例示的なランケートされたHRSポリペプチド C末端ランケーション		
HRS範囲	配列	配列番号
1-80	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	74
1-79	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDV	75
1-78	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFD	76
1-77	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVF	77
1-76	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKV	78
1-75	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREK	79
1-74	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVRE	80
1-73	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVR	81
1-72	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAV	82
1-71	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMA	83
1-70	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQM	84
1-69	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQ	85
1-68	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSR	86
1-67	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS	87
1-66	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYS	88
1-65	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDY	89
1-64	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRD	90
1-63	MAERAAL EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTR	91

10

20

30

40

【表 D 5 - 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 LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	115
3-80	ERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	116
4-80	RAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	117
5-80	ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	118
6-80	ALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	119
7-80	LEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	120
8-80	EELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	121
9-80	ELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK LKAQLGPDESKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVI	122
10-80	LVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLK	123

10

20

30

40

【表 D 5 - 3】

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

10

20

30

40

50

、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150 nM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ポリペプチドバリエーションの結合親和性より、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。

10

【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。

20

【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／またはバリエーション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。

30

【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2 pH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。

40

【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

50

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：14430～1445 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

10

20

【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、得られるバリエーションポリペプチドの性質に主要な効果を有し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H R Sポリペプチド／またはバリエーションH R S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)側鎖の高、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、バリエーションは、生物活性についてスクリーニングされる。

30

40

【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バリエーション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 Biotechnol.、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／またはバリエーション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す、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の実施形態を、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-	<u>M</u> CAERAAL ~~E~~ EE LVKLQGERVR GLKQKQKASAE LIEEEVAKLL KLKAQLGPDE SKQKFVLKTP K	170
HRS(1-60)-A26C-	MAERAAL ~~E~~ EEL VKLQGERVRG LKQQK <u>C</u> SAEL IIEEEVAKLLK LKAQLGPDES KQKFVLKTPK	171
HRS(1-60)-C61	MAERAAL ~~E~~ EEL VKLQGERVRG LKQQKASAE LIEEEVAKLLK LKAQLGPDES KQKFVLKTPK <u>C</u>	172
DNA配列		
HRS(1-60)-M1MC-	ATGTGTGCAGAAAGAGCCGCCCTGGAAGAGTTAGTTAAGTTGCAAGGTG AACGTGTCCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGA AGAAGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGAC GAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCCGAAA	173
HRS(1-60)-A26C-	ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGAAC GTGTTTCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGTGCAGCGCGGAGCTGATCGAAGA AGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGACGAG AGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCCGAAA	174
HRS(1-60)-C61	ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGAAC GTGTTTCGTGGTCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGA AGAGGTGGCCAAACTGCTGAAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGACGAG 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Cys 83、Cys 174、Cys 191、Cys 196、Cys 224、Cys 235、Cys 379、Cys 455、Cys 507、および／またはCys 509（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、Cys 83、Cys 174、Cys 191、Cys 196、Cys 224、Cys 235、Cys 379、Cys 455の任意の1つまたは複数の変異もしくは欠失、またはCys 507およびCys 509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エーションを含む。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 D 7】

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.aturs	M.musculus	R.norvegicus	G.gallus	X.laavis	D.erio	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	MAERAALVELVQLQGERVRGLKQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFLKTPKGTDRDYSRQMAVREKVFDVIRCFKRHGAVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ ~~A~~ DFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEVVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQHGGSLSVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKL VSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	176
HRS(1-506) C174V	MAERAALVELVQLQGERVRGLKQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFLKTPKGTDRDYSRQMAVREKVFDVIRCFKRHGAVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLSLRYDLTPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQ ~~V~~ DFDIAGNFDPMIPDAECLKIMCEIL	177

【表 D 8 - 2】

	SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEDEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	
HRS(1-506) C191A	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAEAL ~~KL~~ MCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEDEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	178
HRS(1-506) C191S	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAE ~~SL~~ KIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEDEVK EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPL	179
HRS(1-506) C191V	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAE ~~VL~~ KIMCEIL SSLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEDEVK NEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGL GDLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEE PLGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEAL EEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLN QLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRT GQPL	180
HRS(1-506) C224S	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAE ~~CL~~ KIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAI ~~SG~~ VSDSKFRTICSSVDKLDKVSWEDEVK EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ LQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPL	181
HRS(1-506) C235S	MAERAALEELVKLQGERVRGLKQQKASAELIEEEVAKLLKLKAQLGPDE SKQKFVLKTPKGTRDYSRQMAVREKVFDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELK ETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGGELLRLRYDLTVPFARYLAMNKL TNIKR YHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDPMIPDAE ~~CL~~ KIMCEILS SLQIGDFLVKVNDRRILDGMFAICGVSDSKFRTI ~~SS~~ SSVDKLDKVSWEDEVK EMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLG DLKLLFEYLTFLGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEP LGVGSVAAGGRYDGLVGMFDPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALE EKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLSELWDAGIKAELLYKKNPKLLNQ	182

10

20

30

40

【表 D 8 - 3】

	LQYCEEAGIPLVAIIQEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVEEIKRRTG QPL	
名称	DNA 配列	配列番号
HRS(1-506) C174A	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGGCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGGCTGATTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCCGCGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAAGTGCCTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	183
HRS(1-506) C174V	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTA TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGGCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGGTTGATTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCCGCGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC	184

10

20

30

40

【表 D 8 - 4】

	GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACGTGCTGTATAAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTGCGGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	
HRS(1-506) C191A	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCTGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTA TTATTGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGGCTTTGAA AATTATGTGTGAAATTTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGAACAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCTGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAACGTGCTGTATAAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAACTGCGTTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTGCGGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	185
HRS(1-506) C191S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCTGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTA TTATTGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTTCGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGAGTTTGAA AATTATGTGTGAAATTTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGAACAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT	186

10

20

30

40

【表 D 8 - 5】

	GAGCTTGGCCCCGCGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	10
HRS(1-506) C191V	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTA TTATTGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTGA TATTGCCGGAATTTGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGGTTTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCCGCGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAAacCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	187 20 30
HRS(1-506) C224S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTTCGACGTTA TTATTGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTTAGCCATGAATAAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTGA TATTGCCGGAATTTGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTGTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTCCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGTACAATCTGCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG	188 40

【表 D 8 - 6】

	GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCCGCGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	
HRS(1-506) C235S	ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGA ACGCGTACGTGGTCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGA AGAAGAAGTTGCCAAATTACTGAAACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGA TGAAAGTAAACAATAATTTGTGTTGAAAACGCCCAAAGGAACCCGTG ATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTCTGTAAGTAATCGATACCCCGT TTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCGT ATTTGAATTGAAAGAGACTCTGATGGGCAATATGGTGAAGATTCTAA ACTGATTTATGATTTGAAAGACCAAGGAGGTGAAGTCTGCTGACCTGCG CTACGACTTAACTGTGCCTTTTGGCCGTTACTTAGCCATGAATAaTTaA CCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGACAACC CTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGA TATTGCCGGAATTTGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTGTTGAA AATTATGTGTGAAATTCTGAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGGTATGTTTGCTATTTGCGGTG TTTCTGATTCCAAATTCGTACAATCTCCTCAAGCGTGGACAAATTGGA TAAAGTGTCTTGGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAG GCCTGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAAC ATGGCGGTGTGTCCTTAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGA GCCAAAATAAACAGCACTTGAAGGACTGGGAGATCTGAAATTACTCT TTGAATATCTGACCTTATTTGGGATTGATGATAAAATTAGCTTTGATCT GAGCTTGGCCCCGCGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTACGAAGCT GTTCTCTTGCAAACCCCAGCCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTC GGCAGTGTGGCAGCCGGTGGTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTT GACCCTAAAGGCCGTAAAGTACCATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTC GAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAAGCTTTGGAGGAAA AGATCCGTACCACGGAaCCAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAAA ACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGG CATCAAGGCCGAAGTGTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTTAAACCA ACTCCAGTATTGTGAAGAAGCTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGG TGAGCAAGAATTAAGAGATGGCGTGATTAACTGCGTTCAGTAACAAG CCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAAATTA AACGCCGCACCGGTCAACCGTTA	189

10

20

30

40

【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エーションへの全長ヒト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C I C (C y s I l e C

50

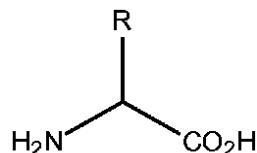
y s) のすべてまたは一部が再挿入される。例示的なシステイン低減済み変異体としては、例えば、配列番号 1～106、131～133、137～143、178、180、182、184、もしくは 186～195 の HRS ポリペプチド配列のいずれか、または表 D1～D9 に列挙した、もしくはこれらから導き出せる HRS ポリペプチドのいずれかにおける、残基 Cys 174、Cys 191、Cys 224、および Cys 235 における変異（もしくはこれらの欠失）、ならびに／または Cys 507 および Cys 509 の欠失もしくは置換（全長ヒト HRS（配列番号 1）の番号付けに基づく）の任意の組合せがある。

【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、複素環式ー、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、アルファークトカルボン酸、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-GlcNAc-β-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 pyrrolidone)、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。

10

【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。

20

【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み込み、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、Ko chendoerfer、Current Opinion in Chemical Biology、9巻：555～560頁、2005年を参照）。

30

【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ブレン（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）。

40

【0381】

50

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、EP 1964854、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US 2009/0280135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エーション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

10

20

30

40

50

同等の条件下で、無修飾または非バリエーション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エーション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、修飾またはバリエーション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エーションHRSポリペプチドは、配列番号1（またはそのバリエーション）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（単位時間あ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、修飾またはバリエーション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エーション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、バリエーションまたは修飾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、いくつかのバリエーションまたは修飾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、修飾またはバリエーションHRSポリペプチドは、同等の条件下で、無修飾または非バリエーション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J α 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、修飾またはバリエーション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

飾または非バリエーション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、修飾またはバリエーション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、J α -1抗体への結合に対してより低いIC₅₀（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、修飾またはバリエーション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エーション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、J α -1競合性ELISAにおけるIC₅₀を有する。いくつかの実施形態では、修飾またはバリエーションHRSポリペプチドは、約0.2 nM未満、約0.18 nM未満、約0.16 nM未満、または約0.15 nM以下である、J α -1競合性ELISAにおけるIC₅₀を有する。

【0390】

ある特定の実施形態では、修飾またはバリエーション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エーション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、修飾またはバリエーション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、修飾またはバリエーション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エーション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

10

20

30

40

50

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、修飾またはバリエーション 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エーション 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、修飾またはバリエーション 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エーション HRS ポリペプチドの融解温度 (T_m) 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、修飾またはバリエーション 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エーション 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 °C 高い融解温度 (T_m) 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、修飾またはバリエーション HRS ポリペプチドは、無修飾または非バリエーション 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、修飾またはバリエーション 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エーション 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 Cys 507 および Cys 509 の欠失 ($\Delta 507 \sim 509$) または置換を有する HRS ポリペプチドは、Cys 507/Cys 509 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 Cys 507/Cys 509 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、バリエーション 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、修飾またはバリエーション HRS ポリペプチドは、無修飾または非バリエーション 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

10

20

30

40

50

の程度)が低減されている。いくつかの実施形態では、修飾またはバリエーションHR S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エーションHR S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】

10

いくつかの実施形態では、修飾またはバリエーションHR Sポリペプチドは、無修飾または非バリエーションHR S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、修飾またはバリエーションHR S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エーションHR S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。

20

【0396】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリエーションHR Sポリペプチドは、無修飾または非バリエーションHR S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、修飾またはバリエーションHR S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エーションHR S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。

30

【0397】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリエーションHR Sポリペプチドは、無修飾または非バリエーションHR S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エーションHR S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。

40

【0398】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリエーションHR Sポリペプチドは、無修飾または非バリエーションHR S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/またはエンドト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エーションHR S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。

50

【0399】

いくつかの実施形態では、修飾またはバリエーションHRSポリペプチドは、無修飾または非バリエーション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、修飾またはバリエーション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エーション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。

10

【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、本明細書の他に記載されている。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。

20

【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。

30

40

【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シェーション体および／またはバリエーションを含めた、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エーション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。

50

【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、またはバリエーション、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エーションは、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、本明細書に記載のランケットされた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	ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCA GGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAGGCCAGC GCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACT GAAGGCACAGCTGGGTCTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTG TGCTCAAAACCCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGG CAGATGGCAGTTTCGCGAGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCG TTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATACACCTGT	24

10

20

【表 D 9 - 2】

		ATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAG ACTCCAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAG CTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTCCCTTTTGCTCGGT ATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTACCAC ATAGCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCG TGGCCGATACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGC TGGGAACCTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAA GATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCCTTCAGATAGGCGACTT CCTGGTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGT TTGCTATCTGTGGTGTCTGACAGCAAGTTCCGTACCATCT GCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGTCTGGGAAGAG GTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGA GGTGGCTGACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTG GGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTAT CCCCAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGAAG TTGCTCTTTGAGTACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAA ATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTAC ACTGGGGTGATCTATGAGGCAGTGTCTGCTACAGACCCACG CCAGGCAGGGGAAGAGCCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTG CTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTTCGACCCC AAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGT GGAGCGGATTTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTT TGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTG GCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCT TGTCTCAGAACTGTGGGATGTGGGATCAAGGCTGAGCTGC TGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAACCAGTTACAGTAC TGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGA GCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTACAGTGA CGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTG GAGGAAATCAAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCTCTGCATCTG C		10
HisRS1 ^{N1}	1-141	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTGCTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACCTGATTTATGACCTGAAAGATCAGGGTGGTGAACCTG CTGAGTCTGCGCTATGATCTGACAGTTCGGTTTGCCCGTTAT CTGGCAATG	25	30
HisRS1 ^{N2}	1-408	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTGCTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACCTGATTTATGACCTGAAAGATCAGGGTGGTGAACCTG CTGAGTCTGCGCTATGATCTGACAGTTCGGTTTGCCCGTTAT CTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTATCACAT TGCTAAAGTCTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACCCGTGG TCGTTATCGTGAGTTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCGG CAACTTTGATCCGATGATCCCGGATGCTGAATGCCTGAAAAT CATGTGTGAGATCCTGAGCAGTCTGCAGATTGGCGATTTCCT GGTGAAAGTCAACGATCGCCGTATTCTGGATGGCATGTTTCG CATCTGTGGTGTTAGCGACTCCAAATTCGTACCATCTGTAG TAGTGTGGACAACTGGATAAAGTGAGCTGGGAGGAGGTGA	26	40

【表 D 9 - 3】

		AAAACGAAATGGTGGGCGAGAAAGGTCTGGCTCCTGAAGTG GCTGACCGTATTGGTGATTATGTCCAGCAGCACGGTGGAGT ATCACTGGTTGAGCAACTGCTGCAAGACCCTAAACTGAGTC AGAATAAACAGGCCCTGGAGGGACTGGGAGATCTGAAACTG CTGTTTCGAGTATCTGACCCTGTTCTGGTATCGATGACAAAATC TCCTTTGACCTGTCACTGGCTCGTGGACTGGACTATTATACC GGCGTGATCTATGAAGCTGTACTGCTGCAAACTCCAGCACA AGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTGGGTAGTGTAGCCGCTG GGGGACGTTATGATGGACTGGTGGGGATGTTGACCCCTAAA GGCCGTAAAGTTCCGTGTGTGGGTCTGAGTATCGGTGTTGAG CGTATCTTTTCCATCGTCGAGCAACGTCTGGAAGCACTGGAG GAAAAAATCCGTACGACCGAA		10
HisRS1 ^{N3}	1-113	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCTGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACCTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTGCGTG CTTTAAACGCCATGGTGGCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACTG	27	
HisRS1 ^{N4}	HRS(1-60)	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCTGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAACCTCCGAAAG	28	20
HisRS1 ^{N8}	HRS(1-506)	ATGGCAGAGCGTGCGGCGCTGGAGGAGCTGGTGAAACTTCA GGGAGAGCGCGTGCGAGGCCTCAAGCAGCAGAAAGGCCAGC GCCGAGCTGATCGAGGAGGAGGTGGCGAAACTCCTGAAACT GAAGGCACAGCTGGGTCTGATGAAAGCAAACAGAAATTTG TGCTCAAAACCCCAAGGGCACAAGAGACTATAGTCCCCGG CAGATGGCAGTTCGCGAGAAGGTGTTTGACGTAATCATCCG TTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAGAAGTCATTGATACACCTGT ATTTGAACTAAAGGAAACACTGATGGGAAAGTATGGGGAAG ACTCCAAGCTTATCTATGACCTGAAGGACCAGGGCGGGGAG CTCCTGTCCCTTCGCTATGACCTCACTGTTCTTTTGCTCGGT ATTTGGCAATGAATAAACTGACCAACATTAACGCTACCAC ATAGCAAAGGTATATCGGCGGGATAACCCAGCCATGACCCG TGGCCGATACCGGGAATTCTACCAGTGTGATTTTGACATTGC TGGGAACTTTGATCCCATGATCCCTGATGCAGAGTGCCTGAA GATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCACTTCAGATAGGCGACTT CCTGGTCAAGGTAAACGATCGACGCATTCTAGATGGGATGT TTGCTATCTGTGGTGTCTCTGACAGCAAGTTCGTACCATCT GCTCCTCAGTAGACAAGCTGGACAAGGTGTCTTGGAAGAG GTGAAGAATGAGATGGTGGGAGAGAAGGGCCTTGACCTGA GGTGGCTGACCGCATTGGGGACTATGTCCAGCAACATGGTG GGGTATCCCTGGTGGAACAGCTGCTCCAGGATCCTAAACTAT CCCAAACAAGCAGGCCTTGGAGGGCCTGGGAGACCTGAAG TTGCTCTTTGAGTACCTGACCCTATTTGGCATTGATGACAAA ATCTCCTTTGACCTGAGCCTTGCTCGAGGGCTGGATTACTAC ACTGGGGTGATCTATGAGGCAGTGCTGCTACAGACCCACAGC CCAGGCAGGGGAAGAGCCCCTGGGTGTGGGCAGTGTGGCTG CTGGAGGACGCTATGATGGGCTAGTGGGCATGTTGACCCC AAAGGGCGCAAGGTGCCATGTGTGGGGCTCAGCATTGGGGT GGAGCGGATTTTCTCCATCGTGGAACAGAGACTAGAGGCTT TGGAGGAGAAGATACGGACCACGGAGACACAGGTGCTTGTG GCATCTGCACAGAAGAAGCTGCTAGAGGAAAGACTAAAGCT TGTCTCAGAACTGTGGGATGCTGGGATCAAGGCTGAGCTGC TGTACAAGAAGAACCCAAAGCTACTGAACCAGTTACAGTAC TGTGAGGAGGCAGGCATCCCACTGGTGGCTATCATCGGCGA	72	30 40

【表 D 9 - 4】

		GCAGGAACTCAAGGATGGGGTCATCAAGCTCCGTTCAAGTGA CGAGCAGGGAAGAGGTGGATGTCCGAAGAGAAGACCTTGTG GAGGAAATCAAAAGGAGAACAGGCCAGCCCCCTC		
HisRS1 ^{N6}	HRS(1-48)	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGAT	73	
HisRS1 ^{II}	191-333	TGCCTGAAAATCATGTGTGAGATCCTGAGTAGTCTGCAAATT GGCGACTTTCTGGTCAAAGTGAACGATCGCCGATTCTGGAT GGCATGTTCGCCATCTGTGGTGTAGCGACTCCAAATTCCTG ACAATCTGTAGCAGCGTGGACAAACTGGATAAAGTGTCTG GGAAGAGGTGAAAAACGAAATGGTGGGTGAAAAAGGTCTG GCTCCGAGGTTGCTGACCGTATCGGTGATTATGTTTCAGCAG CACGGCGGTGTAGTCTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCC GAAACTGTCTCAGAACAAACAGGCCCTGGAAGGACTGGGAG ATCTGAAACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGTTCCGGCATTG ATGACAAAATTTCTTTCGACCTGTCACTGGCACGTGGACTGG ACTATTATACCGGT	29	10
HisRS1 ^{C1}	405-509	CGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAA AAAACTGCTGGAAGAAGCGCTGAAACTGGTTAGCGAACTGT GGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAC CCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGG TATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAAGTAAAG ACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAA GTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACG TCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	30	20
HisRS1 ^{N5}	1-243 + 27aa	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAACTCCGAAAGGAACCCGTGACTATTCTCCTCGTCA AATGGCCGTCCGTGAAAAAGTGTTCGACGTGATCATTGCTG CTTTAAACGCCATGGTGCCGAAGTGATTGATACCCCGGTGTT TGAGCTGAAAGAGACACTGATGGGCAAATATGGTGAGGACA GCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAAGGCGGTGAACTG CTGTCCCTGCGTTATGATCTGACTGTGCCGTTTGCCCGTTATC TGGCCATGAATAAACTGACGAACATTAAACGCTATCACATT GCCAAAGTGTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACTCGTGGA CGTTATCGTGAATTCTATCAGTGTGACTTCGATATTGCCGGC AACTTCGACCCTATGATTCCGGATGCTGAATGCCTGAAAATC ATGTGTGAGATCCTGAGCAGCCTGCAAAATTGGTGACTTCCTG GTGAAAGTGAATGACCGTCGTATCCTGGATGGCATGTTTGCC ATTTGTGGTGTGAGCGATTCCAAATTCCGTACCATCTGATG AGTGTGGACAAACTGGATAAAGTGGGCTATCCGTGGTGGA CTCTTGTAGCCGTATTCTGAACTATCCTAAAACCAGCCGCC GTGGCGTGCTTGGGAAACT	31	30
HisRS1 ^{C2}	1-60 + 175- 509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAACTCCGAAAGACTTCGATATTGCCGGGAATTTTGA CCCTATGATCCCTGATGCCGAATGTCTGAAAATCATGTGTGA GATCCTGAGCAGTCTGCAGATTGGTGACTTCCTGGTGAAAGT GAACGATCGCCGTATTCTGGATGGAATGTTTGCCATTTGTGG CGTGTCTGACAGCAAATTTCTGACGATCTGTAGCAGCGTGGA TAAACTGGATAAAGTGAAGTGGGAGGAGGTGAAAAATGAG ATGGTGGGCGAAAAAGGTCTGGCACCTGAAGTGGCTGACCG TATCGGTGATTATGTTTCAGCAACATGGCGGTGTTTCTCTGGT CGAACAGCTGCTGCAAGACCCAAAACTGAGCCAGAACAAAC AGGCACTGGAAGGACTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTTGAG	32	40

【表 D 9 - 5】

		TATCTGACGCTGTTTGGCATCGATGACAAAATCTCGTTTGAC CTGAGCCTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACCGCGTGATC TATGAAGCCGTCCTGCTGCAAACTCCAGCACAAAGCAGGTGA AGAACCTCTGGGTGTTGGTAGTGTAGCGGCAGGCGGACGTT ATGATGGACTGGTGGGGATGTTTGATCCGAAAGGCCGTAAA GTTCCGTGTGTCGGTCTGAGTATCGGGGTTGAGCGTATCTTT AGCATTGTGGAGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAGGAAAAAAT CCGTACCACCGAAACCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAA AAAAGTCTGGAAGAACGCCTGAAAGTGGTTAGCGAACTGT GGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAC CCGAAAGTCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGG TATTCCTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAG ACGGCGTTATTAAAGTGCCTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAA GTTGACGTTCCGCGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACG TCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	10
HisRS1 ^{c3}	1-60 + 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAGTCCGAAAGTGAATGATCGCCGTATCCTGGATG GCATGTTTGCCATTTGTGGTGTGAGCGACTCGAAATTCGTA CGATTGCTCTAGCGTCGATAAACTGGACAAAGTGTCTGGG AAGAGGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAGGTCTGGC TCCTGAAGTTGCCGACCGTATTGGTGATTATGTTACGACGCA TGGCGGTGTTTCACTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCCGA AACTGTCTCAGAATAAACAGGCGCTGGAAGGACTGGGAGAT CTGAAAGTCTGTTTGAGTATCTGACCCTGTTCCGCATTGAT GACAAAATCAGCTTCGACCTGAGCCTGGCACGTGGTCTGGA TTATTATACCGCGTGATCTATGAAGCCGTTCTGCTGCAGAC ACCAGCACAAAGCAGGCGAAGAACCTCTGGGTGTTGGTTCTG TGGCAGCCGGTGGTCTGTTATGATGGACTGGTAGGCATGTTCTG ATCCGAAAGGCCGTAAAGTTCGCTGTGTGGGACTGAGTATC GGTGTGAGCGTATCTTTAGCATCGTGGAACAACGTCTGGAA GCGCTGGAGGAGAAAAATTCGTACCACCGAAACCCAAGTTCT GGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGA AACTGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAA CTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAAGTCTGTAATCAGCTGCA GTATTGTGAGGAAGCGGGTATTCCTCTGGTGGCCATTATCGG AGAACAGGAAGTGAAGACGGCGTTATTAAAGTGCCTAGCG TGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCGCGTGAAGATCTGG TCGAGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTT GC	33
HisRS1 ^{c4}	1-100 + 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAAGTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTCGATGTGATCATTCTGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGTGAACGATCGCCGATTCTGGATGGCATG TTCGCCATTTGTGGTGTAGCGATAGCAAATTCGCTACAATC TGCTCTAGCGTGGACAACTGGACAAAGTGAGCTGGGAAGA GGTGA AAAACGAGATGGTGGGTGAGAAAGGCCTGGCTCCTG AAGTTGCCGACCGTATCGGAGATTATGTTACGACGATGGC GGAGTTTCACTGGTTGAACAACTGCTGCAAGACCCGAACT GTCTCAGAACAAACAGGCACTGGAAGGTCTGGGAGATCTGA AACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGTTCCGTTATTGACGACA AAATTTCTTCGACCTGTCGCTGGCACGTGGTCTGGATTATT ATACAGGCGTGATCTATGAGGCTGTACTGCTGCAGACACCA GCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTTGGTTCAAGTTGC	34

【表 D 9 - 6】

		TGCCGGTGGACGTTATGACGGACTGGTAGGGATGTTTGACC CAAAAGGCCGTAAAGTCCCGTGTGTAGGACTGTCTATTGGC GTTGAGCGTATCTTTAGCATCGTGGAGCAACGTCTGGAAGCT CTGGAGGAGAAAATCCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGT TGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAAC TGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTG CTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTA TTGTGAGGAAGCGGGTATTCTCTGGTGGCCATTATCGGAGA ACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAAACTGCGTAGCGTGA CCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGGTCG AGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTCG	10
HisRS1 ^{C5}	1-174 + 211-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAACTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTTCGATGTGATCATTTCGT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGAAACCCCTGATGGGCAAATATGGGGAAGAT TCCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAGGGAGGTGAACT GCTGTCTCTGCGCTATGACCTGACTGTTCTTTTGTCTCGTAT CTGGCCATGAATAAACTGACCAACATCAAACGCTATCATAT CGCCAAAGTGATCGCCGTGACAATCCAGCAATGACCCGTG GTCGTTATCGTGAATTTTATCAGTGTGTGAACGATCGCCGTA TTCTGGACGGCATGTTCCGCCATTTGTGGTGTGTCTGACTCCA AATTTTCGTACGATCTGCTCAAGCGTGGACAAACTGGACAAA GTGAGCTGGGAAGAGGTGAAAAACGAGATGGTGGGTGAGA AAGGCCTGGCTCCTGAAGTTGCCGACCGTATCGGAGATTAT GTTCAGCAGCATGGCGGAGTTTCACTGGTTGAACAACTGCTG CAAGACCCGAAACTGTCACAGAACAAACAGGCACTGGAAG GTCTGGGGGATCTGAAACTGCTGTTTCGAGTATCTGACGCTGT TCGGTATTGACGACAAAATCAGCTTCGATCTGAGCCTGGCAC GTGGTCTGGACTATTATACCGGCGTGATTTATGAAGCCGTTT TGCTGCAGACTCCAGCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGT GTTGAAGTGTGGCAGCCGGTGGCCGTTATGATGGTCTGGTT GGCATGTTTGACCCGAAAGGCCGTAAAGTCCCGTGTGTAGG ACTGTCTATCGGCGTGGAGCGTATTTTATGATCGTGGAAACA ACGCCTGGAAGCTCTGGAAGAGAAAAATCCGTACCACCGAAA CCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAA GAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCAT TAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGA ATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTCTCTGGTGG CCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAAA CTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCGCCGT GAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACC TCTGTGTATTTCG	35
HisRS1 ^{C6}	1-60 + 101- 509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGGCGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAACTCCGAAAGAAACCCCTGATGGGCAAATATGGCG AAGATTCCAAACTGATCTATGACCTGAAAGACCAAGGCGGT GAACTGCTGTCCCTGCGTTATGACCTGACTGTTCCGTTTGTCT CGTTATCTGGCCATGAATAAACTGACCAACATTAAACGCTAT CACATTGCCAAAGTGTATCGCCGTGACAATCCTGCTATGACT CGTGGACGTTATCGTGAATTCTATCAGTGTGACTTCGATATT GCCGGCAACTTCGACCCTATGATTCCGGATGCTGAATGCCTG AAAATCATGTGTGAGATCCTGAGCAGCCTGCAAATTGGTGA CTTCTGGTGAAGTGAATGACCGTCGTATCCTGGATGGCAT GTTCGCCATTTGTGGTGTAGCGATTCCAAATTCCGTACCAT	40

【表 D 9 - 7】

		CTGTAGTAGTGTGGACAAACTGGATAAAAGTGAGCTGGGAAG AGGTGAAAAACGAAATGGTGGGCGAAAAAGGTCTGGCACCT GAGGTGCTGATCGTATCGGTGACTATGTCCAGCAGCATGG AGGTGTTTCACTGGTTGAGCAACTGCTGCAAGATCCGAAACT GTCTCAGAACAAACAGGCCCTGGAAGGACTGGGTGATCTGA AACTGCTGTTGAGTATCTGACGCTGTTGCGTATTGATGACA AAATCTCGTTCGACCTGTCTCTGGCTCGTGGACTGGATTATT ATACGGGCGTAATCTATGAAGCTGTCTGCTGCAGACACCA GCACAAGCAGGTGAAGAGCCTCTGGGTGTTGGAAGTGTTGC TGCCGGTGGTCGCTATGACGGACTGGTTGGCATGTTGATCC GAAAGGCCGTAAAGTTCCTGTGTAGGACTGAGCATTGGCG TTGAGCGTATCTTTCCATCGTTGAGCAACGTCTGGAAGCAC TGGAAGAGAAAAATCCGTACCACCGAAACCCAAGTTCTGGTT GCCTCAGCTCAGAAAAAACTGCTGGAAGAACGCCTGAAACT GGTTAGCGAACTGTGGGATGCTGGCATTAAAGCCGAACTGC TGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATCAGCTGCAGTAT TGTGAGGAAGCGGGTATTCTCTGGTGGCCATTATCGGAGA ACAGGAACTGAAAGACGGCGTTATTAACTGCGTAGCGTGA CCTCTCGTGAAGAAGTTGACGTTCCCGTGAAGATCTGGTCG AGGAAATCAAACGTCGTACCGGTCAACCTCTGTGTATTTGC		10
HisRS1 ^{C7}	1-100 + 175-509	ATGGCAGAACGTGCCGCCCTGGAAGAGCTGGTAAAACTGCA AGGCGAGCGTGTTCGTGGTCTGAAACAGCAGAAAGCAAGCG CTGAACTGATCGAAGAAGAAGTGCGGAAACTGCTGAAACTG AAAGCACAGCTGGGTCTGATGAATCAAAACAAAAATTCGT CCTGAAACTCCGAAAGGAACTCGTGATTATAGCCCTCGCC AGATGGCTGTCCGTGAAAAAGTGTTGATGTGATCATTGCT GCTTCAAACGTCATGGTGCCGAAGTCATTGATACCCCGGTGT TCGAGCTGAAAGATTTGATATTGCCGGCAACTTTGATCCGA TGATTCCGGATGCTGAGTGTCTGAAAATCATGTGTGAGATCC TGAGTAGTCTGCAGATTGGGGATTTCTGTTGAAAGTGAAC GATCGCCGTATTCTGGACGGCATGTTTGCCATTGTGGCGTT AGCGATAGCAAAATCCGTACGATCTGTAGCAGTGTGGACAA ACTGGATAAAGTCTCTTGGGAAGAGGTCAAAAACGAGATGG TTGGTGAGAAAGGCCTGGCTCCTGAAGTGGCTGACCGTATT GGTGATTATGTCCAGCAGCATGGTGGTGTTCCTGTTGAA CAACTGCTGCAAGACCCGAAACTGTCTCAGAACAAACAGGC ACTGGAAGGTCTGGGTGATCTGAAACTGCTGTTGAGTATCT GACGCTGTTCCGTATTGACGACAAAATTTCTTCGACCTGTC ACTGGCACGTGGTCTGGATTATTATACAGGCGTAATCTATGA GGCTGTACTGCTGCAAACTCCAGCACAAAGCAGGTGAAGAAC CTCTGGGAGTTGGTAGTGTAGCGGCAGGGGGTTCGTTATGAT GGGCTGGTCGGGATGTTGATCCAAAAGGCCGTAAAGTCCC GTGTGTTGGTCTGTCTATTGGCGTTGAGCGTATCTTCTCCATC GTGGAGCAACGTCTGGAAGCTCTGGAAGAAAAAATCCGTAC CACCGAAACCCAAGTTCTGGTTGCCTCAGCTCAGAAAAAAC TGCTGGAAGAACGCCTGAAACTGGTTAGCGAACTGTGGGAT GCTGGCATTAAAGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAA ACTGCTGAATCAGCTGCAGTATTGTGAGGAAGCGGGTATTC CTCTGGTGGCCATTATCGGAGAACAGGAACTGAAAGACGGC GTTATTAAACTGCGTAGCGTGACCTCTCGTGAAGAAGTTGAC GTTCCCGGTGAAGATCTGGTCGAGGAAATCAAACGTCGTAC CGGTCAACCTCTGTGTATTTGC	37	30
HisRS1 ^{C10}	369-509	ATGTTTCGACCCAAAAGGCCGTAAAGTTCCGTGTGTAGGGCT GTCTATCGGTGTTGAGCGTATCTTCTCCATCGTTGAGCAGCG TCTGGAAGCACTGGAGGAAAAAATCCGTACGACCGAGACTC AAGTCCTGGTTGCTAGTGCCAGAAAAAACTGCTGGAAGAG CGCCTGAAACTGGTTAGTGAGCTGTGGGATGCCGGTATTAA AGCCGAACTGCTGTATAAAAAAAACCCGAAACTGCTGAATC AGCTGCAGTATTGTGAAGAAGCGGGCATTCCGCTGGTAGCG ATTATCGGGGAACAAGAACTGAAAGATGGCGTGATCAAAC	38	40

【表 D 9 - 8】

		GCGTAGCGTTACAAGCCGTGAGGAAGTGGACGTCCGCCGTG AGGATCTGGTTGAAGAGATTAAACGCCGTACAGGTACAGCCT 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、ポリアダ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。

10

【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、42、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。

20

30

【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「バリエーション」も含む。ポリヌクレオチド「バリエーション」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エーションは、デフォルトのパラメータを使用して、本明細書の他に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、バリエーションは、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、42、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エーション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

40

50

の実施形態では、バリエーションは、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。

10

【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NaHPO₄（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NaHPO₄（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）。

20

【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NaHPO₄（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NaHPO₄（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。

30

40

【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NaHPO₄（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NaHPO₄（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

50

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相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）。

10

【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： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} M) + 0.41 (\%G+C) - 0.63 (\% \text{ホルムアミド}) - (600 / \text{長さ})$ 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 $T_m - 15^\circ\text{C}$ 、または中ストリンジェンシーについて $T_m - 30^\circ\text{C}$ で実施される。

20

【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（polyvinylpyrrolidone）、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。

30

【0421】

HRSポリペプチドの生成

40

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

50

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（phosphoramidite 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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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 λ DE3 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る、
10
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) スクレアーゼおよび 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
20
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、Simp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、150 g/L を超える細胞密度でのタンパク質産生、および 10 g/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 などを含む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 pastoris 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
30
40
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 15 L、50 L、100 L、および 200 L 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
50

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)。

10

【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 Piwnicka-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。

20

【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ティ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。

30

【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

40

50

); 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、DHFRCCHO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の攪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。

10

【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。

20

【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ッ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US7,838,265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ッシングも、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ッシングを保証することができる。

30

【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。

40

【0436】

50

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、モロ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、A VおよびA A Vに由来するウイルスベクターを、本発明で使用する事ができる。本発明のH R Sポリペプチドを発現させるのに適したA A Vベクター、組換えA A V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】

10

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】

20

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H R S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H R S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、H R S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】

30

宿主細胞

40

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H R Sポリペプチドは、H R S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H R S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H R S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

50

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、チャーグーストラウス症候群、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HRSP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、PBM C、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、HRSP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、HRSP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HRSPポリペプチド結合タンパク質を用いて、抗ヒスチジルー 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ー 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

10

20

30

40

50

り当てることができる。主要5クラス：I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g M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、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g AおよびI g A 2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（F c）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）F a b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） $F(a b')_2$ 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F a b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F d断片；（iv）抗体の単腕の V_L および V_H ドメインからなるF v断片；（v） V_H ドメインからなるd A b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、F v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F v（s c F v）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Osborn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s c F v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c DNAまたはゲノム配列に連結して、完全I g G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F a b、F v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】

「 $F(a b')_2$ 」および「F a b'」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る、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I g G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 $C_{H\gamma1}$ （H鎖定常領域における $\gamma1$ 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、F a b'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I g Gを切断して、上述のF a b' 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、 $F(a b')_2$ と呼ばれる。

【0459】

F a b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。F a b'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

10

20

30

40

50

、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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、REGISTEREX（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

40

50

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、ヒスチジルー 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。

10

【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ー 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ー 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】

20

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エーション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ー 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】

30

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、鑄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。

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。

40

【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

50

、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 S E L E X（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 A A R S 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。

10

【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（compactity）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 -C y s -G l y -P r o -C y s-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 A A R S 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。

20

【0471】

本発明の A A R S タンパク質断片に特異的に結合する A D N E C T I N S（商標）、A V I M E R S（商標）、アナホン（anaphone）およびアンチカリン（anticalin）も含まれている。A D N E C T I N S（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。A D N E C T I N S（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、A D N E C T I N（商標）が、自己免疫疾患に関連するヒスチジルー t R N A 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。

30

【0472】

A V I M E R S（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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

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HRSP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HRSPリペプチドを含む組成物も含まれている。

40

【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、ヒスチジルー 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HRSP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、HRSPリペプチドは、ヒスチジルー tRNA 合成酵素の少なくとも1個のThエピトー

50

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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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。ヒスチジルー 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、ヒスチジルー 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でできる少なくとも 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、ヒスチジルー 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ー 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

10

20

30

40

50

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ー 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、バリエーション、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に記載されているもしくはそれ

10

【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ー 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ー 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。

20

【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。

30

【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、カプ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。

40

【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10 EU/mgまたはそれ未満のタンパク質となり得る。典型的には、1 ngのリポ多糖（LPS）は、約1～10 EUに相当する。

【0492】

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

50

ペプチド、約 6 EU/mg もしくはそれ未満の HRS ポリペプチド、約 5 EU/mg もしくはそれ未満の HRS ポリペプチド、約 4 EU/mg もしくはそれ未満の HRS ポリペプチド、約 3 EU/mg もしくはそれ未満の HRS ポリペプチド、約 2 EU/mg もしくはそれ未満の HRS ポリペプチド、約 1 EU/mg もしくはそれ未満の HRS ポリペプチド、約 0.1 EU/mg もしくはそれ未満の HRS ポリペプチド、約 0.01 EU/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。

10

【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 0.3 mM～約 100 mM または約 0.3 mM～約 95 mM または約 0.3 mM～約 90 mM または約 0.3 mM～約 85 mM または約 0.3 mM～約 80 mM または約 0.3 mM～約 75 mM または約 0.3 mM～約 70 mM または約 0.3 mM～約 65 mM または約 0.3 mM～約 60 mM または約 0.3 mM～約 55 mM または約 0.3 mM～約 50 mM または約 0.3 mM～約 45 mM または約 0.3 mM～約 40 mM または約 0.3 mM～約 35 mM または約 0.3 mM～約 30 mM または約 0.3 mM～約 25 mM または約 0.3 mM～約 20 mM または約 0.3 mM～約 15 mM または約 0.3 mM～約 10 mM または約 0.3 mM～約 5 mM の範囲の濃度で存在する。

20

【0495】

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

30

【0496】

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

40

【0497】

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

50

は約 5 mM～約 50 mM、または約 5 mM～約 45 mM、または約 5 mM～約 40 mM、または約 5 mM～約 35 mM、または約 5 mM～約 30 mM、または約 5 mM～約 25 mM、または約 5 mM～約 20 mM、または約 5 mM～約 15 mM、または約 5 mM～約 10 mM 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 10 mM～約 100 mM、または約 10 mM～約 95 mM、または約 10 mM～約 90 mM、または約 10 mM～約 85 mM、または約 10 mM～約 80 mM、または約 10 mM～約 75 mM、または約 10 mM～約 70 mM、または約 10 mM～約 65 mM、または約 10 mM～約 60 mM、または約 10 mM～約 55 mM、または約 10 mM～約 50 mM、または約 10 mM～約 45 mM、または約 10 mM～約 40 mM、または約 10 mM～約 35 mM、または約 10 mM～約 30 mM、または約 10 mM～約 25 mM、または約 10 mM～約 20 mM、または約 10 mM～約 15 mM の範囲の濃度で存在する。

10

【0499】

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

20

【0500】

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

30

【0501】

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

40

【0503】

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

50

M～約 55 mM、または約 35 mM～約 50 mM、または約 35 mM～約 45 mM、または約 35 mM～約 40 mM 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 40 mM～約 100 mM、または約 40 mM～約 95 mM、または約 40 mM～約 90 mM、または約 40 mM～約 85 mM、または約 40 mM～約 80 mM、または約 40 mM～約 75 mM、または約 40 mM～約 70 mM、または約 40 mM～約 65 mM、または約 40 mM～約 60 mM、または約 40 mM～約 55 mM、または約 40 mM～約 50 mM、または約 40 mM～約 45 mM の範囲の濃度で存在する。

【0505】

10

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

20

【0507】

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

30

【0509】

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

40

【0510】

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

50

【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】

10

20

30

40

50

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J α -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。

10

【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。

20

【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J α -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。

30

40

【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

50

、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（ T_m ）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

10

20

30

40

50

【 0 5 2 2 】

10

20

20

30

40

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、HRSPolipeptidの1種または複数種の生化学的、物理学および／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。

10

【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HRSPolipeptid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J α -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、HRSPolipeptid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HRSPolipeptid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。

20

【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HRSPolipeptid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HRSPolipeptid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。

30

【0528】

いくつかの実施形態において、HRSPolipeptidの「安定性」は、その「機能的安定性」を含む、あるいはHRSPolipeptid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J α -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、HRSPolipeptid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HRSPolipeptid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

40

50

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(T_m)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。

10

【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。

20

【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 400 mM (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 50～100 mM 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 $\geq$ 約 140 mM NaCl、約または $\geq$ 約 280 mM NaCl を有する。

30

【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。

40

【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

50

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(T_m)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、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。

10

【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2.5～5.0、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

20

30

40

50

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(T_m)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PEG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)、Pluronic(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

10

20

30

40

50

、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、HRSPオリゴペプチドの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HRSPオリゴペプチドは、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HRSPオリゴペプチドよりも、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% 30
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HRSPオリゴペプチドは、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HRSPオリゴペプチドよりも、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% 40
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HRSPオリゴペプチドは、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HRSPオリゴ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% 50
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HRSPオリゴペプチドは、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】

10

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℃で約もしくはは少なくとも約3時間または約しくは少なくとも約3日間または約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】

20

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-HPLC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。

30

【0550】

いくつかの態様において、HRS組成物は、ブルロニック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、約しくは少なくとも約3時間または約しくは少なくとも約3日間または約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。

40

【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

50

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、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。

10

【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、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。

【0555】

いくつかの態様において、HRS 組成物は、ブルロニック 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。

20

【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

30

40

50

～4.0、2.0～3.5、2.0～3.0、2.0～2.5 mM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、2.5～3.0 mMの濃度範囲でまたは約3.0～5.0、3.0～4.5、3.0～4.0、3.0～3.5 mMの濃度範囲でまたは約3.5～5.0、3.5～4.5、3.5～4.0 mMの濃度範囲でまたは約4.0～5.0、4.0～4.5もしくは4.5～5.0 mM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 (オ-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5.0 mM (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、0.1～0.5 mM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、0.2～0.5 mM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、0.5～1.0 mM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、1.0～1.5 mM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、1.5～2.0 mM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、2.0～2.5 mM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、2.5～3.0 mMの濃度範囲でまたは約3.0～5.0、3.0～4.5、3.0～4.0、3.0～3.5 mMの濃度範囲でまたは約3.5～5.0、3.5～4.5、3.5～4.0 mMの濃度範囲でまたは約4.0～5.0、4.0～4.5もしくは4.5～5.0 mM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、0.07、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、0.07、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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（T_m）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T_m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～

50

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

10

20

30

40

50

～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T_m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、

10

20

30

40

50

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、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。

【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 10～50 mg/ml の濃度で含み、約 40～50 mM ヒスチジン (例えば、L-ヒスチジン)、約 140～240 mM 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 (これらのバリエーションを含む) 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エーションである。

【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-メチルピシクロ(2,2,2)-オクタ-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、あるいは食事中的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 (subconjunctival)、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、局所のおよび皮下を含む非経口の投与を含む、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。非経口の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。

10

【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-c o-グリコール酸) (PLGA)、ポリ (DL-ラクチド-c o-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。

20

30

【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。

40

【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

50

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

10

20

30

40

50

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（polytetrafluoroethylene）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-c o -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ユ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、A t r i g e l（登録商標）（Q L T、I n

10

20

30

40

50

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、従来する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】

10

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。

20

【0598】

30

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。

40

【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

50

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0.1 mg/kg～約15 mg/kgまたは約15 mg/kg～約50 mg/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0.1 μg/kg～約0.1 mg/kg～約50 mg/kg体重（例えば、約0.1～15 mg/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4 mg/kgのポリペプチドの初回負荷用量、続いて約2 mg/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0.1 mg/kg～約20 mg/kg～100 mg/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。

10

【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-CSF、IC30、IC31、イミキモド（ALDARA）、ImuFact IMP321、インターフェロナー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、JuvImmune、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ジョン、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Ribidi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-α、IFN-β）（Gabrilovichら、1996年）に直接的に関連付けられてきた。

20

30

40

50

【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、CD4

T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、Mollogen(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(sorafenib)、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、ピラミン、クロルシクリジン (chlorcyclizine)、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。

10

【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、ピリトレキサム、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、クラドリピン、フルダラピン、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、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ドキシフルリジン、エミテフル (emitefur)、エノシタピン、フロクスウリジン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、テガフル (tagafur)) が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【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、エノキシロン、フルアザコート (fluazacort)、フルクロロニド (flucoronide)、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、酢酸フルベロロン、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。

30

40

【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

50

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)、フェブラゾン、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、PIPEBUZON (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 (eter salate)、フェンドサル (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 (parsalimide)、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、フェブラジノール (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；ダブソン；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

10

20

30

40

50

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；デオキシス帕ガリン；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；エブラツズマブ（epratuzmab）を含む抗CD22抗体；ベリムマブ（ベンリスタ（benalysta））を含む抗B L y S（CD257）抗体；オクレリズマブ、リツキシマブおよびオフアツムマブを含む抗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「R I T U X A N（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I g G₁カップー免疫グロブリンである。リツキシマブは、およそ8.0 nM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、エブ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B L y S（CD257）抗体；オクレリズマブ、リツキシマブ、オフアツムマブを含む抗CD20抗体および「リツキシマブ」または「R I T U X A N（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）、アルファートコフェロール、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（astaxanthin）、リコピン、N-アセチルシステイン、カルノシン、ガンマー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、G i n k g o B i l o b a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0.1 mg/kg/24時間～約55 mg/kg/24時間、より好ましくは、約2 mg/kg/24時間～約20 mg/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師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、医師は、医師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、植え込み式デポ等）を含むこともできる。

【0620】

本発明の別の態様において、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スプライスバリエーションおよび／または該スプライスバリエーションの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スプライスバリエーションに独特である。いくつかの実施形態において、係るHRSスプライスバリエーションは、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】

スプライスバリエント、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。

10

【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価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。

20

【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の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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

【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一帰無仮説は、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。

30

40

【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0.05×、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、

50

．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、ヒスチジール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。

10

【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。

20

30

【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。

40

【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、

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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。

50

【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；Schen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よい。核酸マイクロアレイは、いわゆる、Schen（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）；Schen（編）、Microarray Biochip: Tools and Technology、Eaton Publishing Company/BioTechniques 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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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（ T_m ）、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。

10

【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、スプライスバリエーションの独特なスプライスジャンクションの検出による等、AARSスプライスバリエーションの検出に関する。

20

【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ピングするための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、ウェ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。

30

【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ー 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に記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。

40

【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Joiner 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。

50

【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ー 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、ヒスチジルー 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ー 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。

10

【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ー 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ー 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】

20

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ー 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) 野生型ヒスチジルー tRNA 合成酵素と比較して、抗ヒスチジルー 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ー 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、ヒスチジルー 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。

30

【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ー 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ー 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。

40

【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ー 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ー 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、ヒスチジルー 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。

50

【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ー 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ー 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ー 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つ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。

10

【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Ouellette 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。

20

30

【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。

40

【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

50

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)、Mittra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】

ATGGCAGAACGTGCGGCATTGGAAGAATTGGTTAAACTGCAAGGTGAACGTGTTTCGTGG
TCTGAAGCAGCAGAAGGCTAGCGCGGAGCTGATCGAAGAAGAGGTGGCCAAACTGCTG
AAGCTGAAGGCGCAGCTGGGCCCCGACGAGAGCAAACAAAAGTTCGTCCTGAAAACCCC
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】

MAERAALVELVQLQGERVRGLKQQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKH
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

10

20

30

40

50

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2 g/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100 µg/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。MFC S/D Aソフトウェアを備える4 L発酵槽 (Sartorius Biostat Bプラス) を、フェドバッチ発酵に使用した。攪拌は、1000 rpm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4 L/分で空気を提供した。空気は、0.2 µm Midisart 2000 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°C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、3 Lであった。30°C、250 rpmで一晩育成した150 mL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、0.9 mL/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。600 nmにおける細胞の光学密度が約30に達したら、0.5 mM 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°C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 (70 g) を、280 mL (即ち、4 mL/g 細胞ペースト) の溶菌 (lysis) 緩衝液 (50 mM Tris、300 mM NaCl、10 mM イミダゾール、5 mM β-ME、pH 7.5) 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/50 mL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15,000 psiで2回通した。ライセートを15,000 × gで30分間、4°Cで遠心分離した。0.45 + 0.22 µm Acropak 400 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 (50 mM Tris、300 mM NaCl、10 mM イミダゾール、pH 7.5) 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 (50 mM Tris、300 mM NaCl、300 mM イミダゾール、pH 7.5) 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 (10 mM リン酸 Na、pH 7.0) で20倍希釈し、SP 結合緩衝液で前平衡化した33 mL 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2.6 cm、高さ6.2 cmであった。10カラム容量に及ぶSP 結合緩衝液における0~0.5 M 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6 mg/mLとなるよう濃縮し、緩衝液をPBS (Invitrogen product #10010) に交換し、0.22 µm 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、150 mg (70 g 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、<1.7 EU/mgであった。

【0696】

(実施例2)

H I S タグ付き全長ヒスチジルー t R N A 合成酵素 (H R S) の産生

【0697】

コドン最適化および遺伝子合成。全長H i s R S 遺伝子をE. c o l i 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p E T 2 1 a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×H i s タグをC末端に付着した。

【0698】

D N A 配列を次に示す。

【化4】

ATGGCGGAACGTGCCGCACTGGAAGAATTGGTTAAATTACAGGGAGAACGCGTACGTGG
TCTTAAACAACAAAAAGCCTCTGCGGAATTGATTGAAGAAGAAGTTGCCAAATTACTGA
AACTGAAAGCTCAACTTGGACCCGATGAAAGTAAACAAAAATTTGTGTTGAAAACGCCC
AAAGGAACCCGTGATTATAGTCCACGTCAAATGGCCGTTTCGTGAAAAAGTGTTCGACGTT
ATTATTCGCTGTTTTAAACGTCACGGTGCTGAAGTAATCGATACCCCCGTATTTGAATTG
AAAGAGACTCTGATGGGCAAATATGGTGAAGATTCTAAACTGATTTATGATTTGAAAGA
CCAAGGAGGTGAACTGCTGAGCCTGCGCTACGACTTAACTGTGCCTTTTGCCCGTTACTT
AGCCATGAATAAaTTaACCAACATCAAACGTTACCATATTGCAAAAGTATATCGCCGCGA
CAACCCTGCAATGACTCGTGGACGCTATCGCGAATTCTATCAGTGTGATTTTGATATTGC
CGGAAATTTGACCCGATGATCCCGGATGCCGAGTGTTTGAAAATTATGTGTGAAATTCT
GAGTTCGTTGCAGATCGGAGACTTTCTTGTA AAAAGTTAATGACCGCCGTATTCTGGATGG
TATGTTTGCTATTTGCGGTGTTTCTGATTCCAAATTCGTAACAATCTGCTCAAGCGTGGAC
AAATTGGATAAAGTGTCTTGGAAGAAGTAAAAAATGAAATGGTGGGAGAAAAAGGCC
TGGCTCCAGAAGTAGCAGACCGTATTGGTGACTATGTTCAACAACATGGCGGTGTGTCCT
TAGTCGAACAGTTATTACAGGATCCTAAACTGAGCCAAAATAAACAAGCACTTGAAGGA
CTGGGAGATCTGAAATTACTCTTTGAATATCTGACCTATTTGGGATTGATGATAAAATT
AGCTTTGATCTGAGCTTGGCCCGCGGTCTTGATTATTATACCGGCGTGATTTACGAAGCT
GTTCTCTTGCAAACCCAGCCAGGCGGGCGAAGAGCCTTTGGGAGTCGGCAGTGTGGC
AGCCGGTGGTTCGTTATGATGGTTTGGTAGGAATGTTTGACCCTAAAGGCCGTAAAGTACC
ATGTGTGGGGCTTTCTATCGGTGTCGAACGTATCTTTTCTATTGTTGAACAACGTCTTGAA
GCTTTGGAGGAAAAGATCCGTACCACGGAaCCAAAGTCTTAGTTGCaAGTGCCCAAAAA
AAACTGTTAGAAGAACGCCTGAAACTCGTATCAGAACTTTGGGACGCCGGCATCAAGGC
CGAACTGCTGTATAAAAAGAACCCGAAATTGTAAACCAACTCCAGTATTGTGAAGAAG
CTGGGATCCCACTCGTAGCTATTATTGGTGAGCAAGAATTAAGATGGCGTGATTAAAC
TGCGTTCAGTAACAAGCCGTGAAGAGGTAGATGTACGTCGCGAAGACTTAGTGGAAGAA
ATTAAACGCCGCACCGGTCAACCGTTATGTATTTGCGCGGCCGCACTCGAGCACCACCAC
CACCACCACTGA (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】

MAERAALVELVVKLQGERVRGLKQQKASAELEEEVAKLLKLKAQLGPDESKQKFVLKTPKG
 TRDYSPRQMAVREKVFVDVIIRCFKRHGAVIDTPVFELKETLMGKYGEDSKLIYDLKDQGG
 LLSRLYDLTVPFARYLAMNKLNTIKRYHIAKVYRRDNPAMTRGRYREFYQCDFDIAGNFDP
 MIPDAECLKIMCEILSSLQIGDFLVKVNDRRILDMFAICGVSDSKFRTICSSVDKLDKVSWE
 VKNEMVGEKGLAPEVADRIGDYVQQHGGVSLVEQLLQDPKLSQNKQALEGLGDLKLLFEY
 LTLFGIDDKISFDLSLARGLDYYTGVIYEAVLLQTPAQAGEEPLGVGSVAAGGRYDGLVGMF
 DPKGRKVPCVGLSIGVERIFSIVEQRLEALEEKIRTTETQVLVASAQKKLLEERLKLVSSELWD
 AGIKAELLYKKNPKLLNQLQYCEEAGIPLVAIIGEQLKDGVIKLSVTSREEVDVRREDLVE
 EIKRRTGQPLCICAAALEHHHHHHH (配列番号 43)

10

【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(1 µL)を50 µL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(500 µL)を加え、チューブを37℃、250 rpm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(50 µL)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。

20

【0701】

培地。200 mLの無菌M9最小塩5×(BD248510)、778 mLの無菌精製水における30 g/L酵母エキス(BD212750)、20 mLの滅菌20%グルコース(Sigma G7021)および2 mLの無菌1.0 M 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2 g/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100 µg/mLとなるようアンピシリンを加えた。

30

【0702】

フェドバッチ発酵。MFC S/DAソフトウェアを備える4 L発酵槽(Sartorius Biostat Bプラス)をフェドバッチ発酵に使用した。攪拌は、1000 rpm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4 L/分で提供した。空気は、0.2 µm Midisart 2000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、3 Lであった。一晩30℃、250 rpmで育成した150 mL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、0.9 mL/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。600 nmにおける細胞の光学密度が約3.0に達したら、0.5 mM 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。

40

【0703】

HisRSの精製。凍結した細胞ペースト(40 g)を、160 mL(即ち、4 mL/

50

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、pH 8.0、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。0.22 μ m Acropak 200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、pH 8.0、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、pH 8.0、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、pH 7.4)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)+1mM DTTに交換し、0.22 μ m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エーション(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の治療法は存在しない。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】

10

20

30

40

50

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。

10

【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aTyrl920を与えた。群3に、-1~5日目に、経口投与の2mg/kgプレドニゾン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。

20

【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。

30

【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

40

【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

50

検形式で組織切片を調査した。表 E 2 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 E 2】

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	病巣減少になし；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	病巣減少になし；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

10

20

30

【0718】

結果：全 T N B S 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 3 m g / k g の H R S (1 ~ 5 0 6) または 1 および 5 m g / k g の H R S (1 ~ 6 0) 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 E 3) 。 3 m g / k g の H R S (1 ~ 5 0 6) 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 E 3) 。 2 m g / k g 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 3 m g / k g の H R S (1 ~ 5 0 6) または 1 および 5 m g / k g の H R S (1 ~ 6 0) による処置は、T N B S + ビ

40

【0719】

【表 E 3】

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5 mg/kgのHRS（1～60）ならびに1および3 mg/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した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10 mM 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、2 mM DTT、pH 7.4における6.65 mg/ml（実施例2））を先ず完全に還元した。30 mM（「低」）または100 mM（「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。4 Mグアニジンとタンパク質の45分間50℃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、10 kDa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 pH 7.4において4℃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 1 m/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、 $5\text{ }\mu\text{g}$ 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 ($2\sim 60\%$ 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、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2.1\times 150\text{ mm}$ 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、Mass Hunter (Agilent) により解析した。Mass Hunter Bioconfirm (Agilent) により、測定された分子量を計算した。

【0725】

10

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°C 30 分間の 4 M 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 Lys C 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、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $2.1\times 150\text{ mm}$) において試料を先ず分離した。勾配は、 $1\sim 3\%$ 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。

20

【0727】

30

【表 E 4】

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	VFDVIR <u>C</u> FK (配列番号 190)	56.24	1239.68
Cys174 Cys191	155- 193	VYRRDNPAMTRGRYREFYQ <u>C</u> DFDIAGNFDPMPDAE <u>C</u> LK (配列番号 191)	61.27	4673.14
Cys196	194- 210	IM <u>C</u> EILSSLQIGDFLVK (配列番号 192)	73.14	1909.01
Cys224	211- 230	VNDRRILDGMFAI <u>C</u> GVSDSK (配列番号 193)	58.53	2196.08
Cys235	231- 240	FRTI <u>C</u> SSVDK (配列番号 194)	22.8	1155.57
Cys235	231- 243	FRTI <u>C</u> SSVDKLDK (配列番号 195)	28.77	1511.79
Cys379	377- 403	VPC <u>V</u> GLSIGVERIFSIVEQRLEALEEK (配列番号 196)	81.00	3013.63
Cys445	448- 472	LLNQLQY <u>C</u> EEAGIPLVAIIGEQLK (配列番号 197)	72.46	2784.48
Cys505 Cys509	500- 509	RRTGQPL <u>C</u> I <u>C</u> (配列番号 198)	27.17	1146.57

10

20

【0728】

結果は、C y s 2 3 5、C y s 5 0 7およびC y s 5 0 9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）

30

システイン含量が変更された修飾H R S ポリペプチドの作製

【0730】

全長H R S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 E 5 - 1】

表 E5		
変異	オリゴ配列	配列番号
C83	5'- GTTGACGTAATCATCCGTTGCTTCAAGCGCCACGGTGCAG-3' (前方向)	199
C83	5'- CTGCACCGTGCGCTTGAAGCAACGGATGATTACGTCAAAC-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'- GCAGAGTGCCTGAAGATCATGTGCGAGATCCTGAGTTCCTTC-3' (前方向)	205

10

【表 E 5 - 2】

C196	5'- GAAGTGAACCTCAGGATCTCGCACATGATCT TCAGGCACTCTG C-3' (逆方向)	206
C224	5'- CTAGATGGGATGTTTGCTATCTGTGGTGTCTTGACAGCAAGTTC-3' (前方向)	207
C224	5'- GAACTTGCTGTCAGAAACACCACAGATAGCAAACATCCCATCTAG-3' (逆方向)	208
C235	5'- CAGCAAGTTCGTAACCATCTGCTCCTCAGTAGACAAGCTGG-3' (前方向)	209
C235	5'- CCA GCT TGTCTACTGAGGAGCAGATGGTACGGAACTTGCTG-3' (逆方向)	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'- GGGATGCCTGCCTCCTCACAGTACTGTAAGTGG 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

20

30

40

【0732】

活性部位力価測定データを確認するため、プログラム Getareal. 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、Cys 235、Cys 507 および Cys 509 に加えて、配列番号 1 の Cys 174、Cys 191 および Cys 224 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、Cys 174 および Cys 191 が、内部

50

ジスルフィド結合を形成することができ、一方、C y s 5 0 7 および C y s 5 0 9 は、H R S 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、J o - 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、このバリエーションが、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	CGCGAATTCTATCAGGTTGATTTTGATATTGCCGG (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	CCAAATTCCGTACAATCTCCTCAAGCGTGACAAATTGG (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、QuickChange 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) ブロスにおいて一晚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 Maxikit (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】

各残基の変異の影響を評価するため、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 J o - 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エーション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 低下バリエーションが全て、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エーションは、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価するため、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 LC5317) を使用して、等電点電気泳動 (isoelectric focusing) ゲル (pH3~10) 上

に試料 (10 μ g) をローディングし、1 $\times$ 陰極緩衝液 (上部チャンバー) および 1 $\times$ 陽極緩衝液 (下部チャンバー) を用いて、100 V で 1 時間、200 V で 1 時間および 500 V 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 Instant Blue (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 0.5 mg/mL となるよう 100 μ L 最終容量の PBS、pH 7.0 (150 mM NaCl、20 mM 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 5 μ L を 100 μ L の試料に加えた。混合物を 384 ウェルクリアオブティカル反応プレート (Applied Biosystems/Life Technologies P/N 4309849) 内に各ウェル 20 μ L 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 $^{\circ}$ C/秒で始まり、25 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C/秒の速度で温度を 99 $^{\circ}$ C 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 0.3 mL/分、200 mM リン酸 Na、150 mM NaCl、pH 7.0 の移動相を使用した TSK Gel Super SW3000、4.6 mm ID $\times$ 30 cm、4 μ m 粒子サイズ、250 $\text{\AA}$ 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 (40 μ g) 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】

2 μ g/mL の濃度となるよう PBS で調整した 50 μ L 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 4 HBX) において、競合的 ELISA を行った。プレートを密封し、一晩 4 $^{\circ}$ C 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 100 μ L 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 $^{\circ}$ C で、システイン低下競合分子 (1×10^{-6} M $\sim$ 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 -J α -1 抗体 (GenWay GWB-FB7A3D または Immunovision HJO-0100)

10

20

30

40

50

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50 μ L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50 μ L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、50 μ L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50 μ L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。

10

【0746】

各HARS506システインバリエーション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5 μ M HARS、10mM MgCl₂、50 μ M ATP、20mM L-ヒスチジン、2 μ g/mL無機ピロホスファターゼ、1.65 μ M [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PVDフ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。

20

【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	T _m	低分子量 凝集体%	高分子量 凝集体%	ELISAアッセイ によるIC ₅₀	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

30

【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T_m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。

40

【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

50

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 E 9 に収載されている次のプライマーを使用した。

【表 E 9】

表 E9		
配列番号	オリゴ配列	変異
Delete CICAAL E For	5'-CGCCGCACCGGTCAACCGTTACACCACCACCACCACCTG-3'	66
Delete CICAAL E Rev	5'-CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGT AAC GGT TGA CCG GTG CGG CG-3'	67

10

【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) ブロスにおいて一晚 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 E 10 に収載されている次のプライマーを使用した。

20

【表 E 10】

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

30

【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 (400 g) を、4 容量 (1600 mL) の溶菌緩衝液 (50 mM Tris、50 mM NaCl、5 mM MgCl₂、2 mM L-システイン、pH 7.4) 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 05 6 489 001) を、1 錠剤/50 mL の比で懸濁液に加えた。この懸濁液を、氷で冷却しつつ 18,000 psi 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 (0.8/0.2 μm, Pall, PN12675) により上清を濾過した。

40

【0754】

50

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。¹/₂CV/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（0.2μm）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（¹/₂CV/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2×0.1m²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（¹/₂CV/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、一晚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

10

20

30

40

50

ートした。初回結合インキュベーション後に、プレートにP B S Tで5回洗浄した。次に、1 : 5, 0 0 0希釈の5 0 μ Lの検出抗体(A b D S e r o t e cヤギ抗ヒトI g G F (a b ') 2 : H R P 0 5 0 0 - 0 0 9 9)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P B S Tで洗浄し、5 0 μ L T M B基質(T h e r m o S c i e n t i f i c P i e r c e T M B基質P I - 3 4 0 2 1)を加えた。反応を8分間進め、その時点で5 0 μ Lの2 M硫酸停止溶液を加えた。4 5 0 n MにおけるS p e c t r a M a x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H R Sと比較したH i s R S^{N 8} (H R S 1 ~ 5 0 6) (図5)、全長H R Sと比較したリゾカイン(H i s R S^{N 4} : H R S (1 ~ 6 0)) (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H R S (図3)の競合的E L I S Aの代表的な結果を示す。データは、H i s R S^{N 8}および全長H R Sが、抗J o - 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J o - 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、H i s R S^{N 8}および全長H R Sの両方は、ヒスチジル-t R N A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J o - 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。

10

【0762】

その上、データは、驚くべきことに、全長ヒスチジル-t R N A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(H i s R S^{N 4})が、抗J o - 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J o - 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(H i s R S^{N 4})を患者に投与することができる。

20

【0763】

この観察をさらに探索するため、伝統的な力価測定E L I S Aを使用して追加的な競合試験を行った(図6)。結果は、H i s R S^{N 4}または本質的に全長ヒスチジル-t R N A合成酵素が、プレートの表面に付着される場合、抗J o - 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E L I S A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。

30

【0764】

(実施例8)

抗J O - 1抗体エピトープ特異性の評価

【0765】

種々の患者由来の抗J o - 1抗体のエピトープ特異性を評価するため、R D L (カリフォルニア州)から血清試料を得て、枯渇E L I S A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 . c o l iにおいて発現および精製された、図7に収載されているH i sタグ付けしたタンパク質試料によりE L I S A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E L I S A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-t R N A合成酵素が結合した新たなE L I S A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J o - 1抗体結合の一部を計算することが可能になる。

40

【0767】

図8に示すデータは、W H E Pドメイン領域(1 ~ 6 0)とタンパク質の残りの一部(d W H E P)の両方に対し幅広い範囲の抗体特異性を示す。

【0768】

50

(実施例9)

HR SポリペプチドによるJ O-1抗体の体外除去

【0769】

患者血清から抗HR S抗体（例えば、抗J o-1抗体）を有効に免疫枯渇するためにHR Sポリペプチドを使用することができるか評価するため、HR S（1～506）およびHR S（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HR S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J o-1抗体力価を測定して、抗J o-1抗体を除去するHR Sポリペプチドそれぞれの能力を評定した。

【0770】

HR Sポリペプチドの固定化およびJ o-1抗体枯渇。メーカーの推奨するところ（B i o-R a d A f f i-g e l 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、HR S（1～506）、HR S（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J o-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HR S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J o-1抗体力価を決定した。

【0771】

J o-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、J o-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HR S（1～506）の両方が、ヒト血清試料からのJ o-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、HR S（1～506）は、1回の親和性樹脂通過により、検出可能なJ o-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、HR S（1～60）の使用は、検出可能なJ o-1抗体の約20%しか枯渇させることができず、このHR Sポリペプチドが循環J o-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HR S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

10

20

30

40

50

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週齢の雌スプラグドローリー（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、pH 7.0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、50mL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、20mLのRNAおよび30mLの逆転写マスターミックス（AmbionのTaqMan

10

20

30

40

50

Pre Amp 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DELTA gene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10mL反応液(2.5mLのcDNA、7.5mL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(7mLエキソヌクレアーゼ試料+18mL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、4.4mL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3.6mLの20mM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、4.5mL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3mL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5mL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#H00003035-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#H00003035-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-HRP(Invitrogen cat#434323、Lot#816755A)を使用し

10

20

30

40

50

、TMB基質（Thermo #34021）を使用し、2 M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0.6～2 μg/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500 ng/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、200 ng/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、450 nmにおける吸光度を読み取った。

10

【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】

$$\frac{(\text{測定値}-\text{実際値}) \times 100\%}{(\text{実際値})}$$

20

【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（Indexx）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-80℃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。

30

【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+3 mg/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、1 mg/kgおよび3 mg/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0.3 mg/kg HRS（1～506）投薬ラットと比較して、1 mg/kgおよび3 mg/kg HRS（1～506）を投薬したスタチン処置

40

50

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-γ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）を投与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

10

20

30

40

50

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學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（Index）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

10

20

30

40

50

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、HR S (1~506)またはデキサメタゾン(D E X)で処置した動物の体重、吊り時間またはC B C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、HR S (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C K、A S TおよびL D H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、C K、A S TおよびL D H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、HR S (1~506)が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(D M D)のm d x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、HR S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(L G M D 2 B)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。L G M D 2 Bは、進行性対称的筋衰弱および著しく侵襲的な免疫/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(H L A - D R、H L A - A B C、C D 8 6)、C D 8 +細胞傷害性T細胞およびC D 4 + 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】

S J L/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171b pのインフレイム欠失を有する。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、S J L/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。S J L/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C D 4 + 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】

S J L/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。S J L/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HR S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HR Sで免疫化して、いかなる内在性HR Sも隔離した。HR S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HR Sポリペプチドの役割に追加的な支持を提供する。

【0806】

全長H A R S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(C F A)と共にS J L/Jマウスを免疫化し、15および29日目にI F A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、S L J / J 雄マウス (J A X l a b s) ; (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(I d e x x)。

【0808】

結果:mH i s R Sで皮下免疫化したS J L / Jマウスは、全長H i s R S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、a C K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、H i s R S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。

10

【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)の決定に關与した。

20

【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。

30

【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。

40

【0814】

pH:マイクログローブ(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校正および測定を行った。

【0815】

50

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】

TSK Gel 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% 1.4.3M 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（Blue Plus 2、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Instant Blue（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

10

20

30

40

50

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晚透析により、表示のpH（pH 5.5、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、pH 7～7.5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、pH 6.5～7.5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、pH 5.5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）。pH 5.5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。

10

【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】

20

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～pH 7.5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 E 1 3】

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

【0 8 2 3】

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、0.03 mMもの低さのヒスチジン濃度において明らかであり、5 mM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0.03 mM～50 mM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2 mM～約50 mM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。

【0 8 2 4】

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、pH 6.0～7.5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、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、これらの試験を行った。これらの試験から得られた結果を表E14にまとめる。

【0 8 2 5】

【表 E 1 4 - 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

10

20

【表 E 1 4 - 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日間 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								

【0 8 2 6】

結果は全体として、タンパク質が、約 pH 7.0 ～ 約 pH 7.5 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 pH 7.0 ～ 約 7.5 の範囲内であることが結論付けられる。

【0 8 2 7】

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 E 15 にまとめる。

【0 8 2 8】

10

20

30

40

【表 E 1 5 - 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

10

20

30

40

【表 E 1 5 - 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 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
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 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		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 pH 7.0 ~ pH 7.4 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 °C 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 (pH 6.7 ~ 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

10

20

30

40

50

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】

HR S 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（280 mM NaCl）を含む種々の潜在的賦形剤を使用して、HR S（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 E 1 6 - 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	

10

20

30

40

【表 E 1 6 - 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 5 C		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		

10

20

30

40

【表 E 1 6 - 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 5 C		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									

【0 8 3 3】

これらの結果は、ヒスチジン緩衝剤の存在下における、pH 7.0～pH 7.5 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 E 1 7 に記載されている組合せを評価した。

【0 8 3 4】

10

20

30

40

【表 E 1 7 - 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 E 1 7 - 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	

10

20

30

40

【表 E 1 7 - 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 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	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									

【0 8 3 5】

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。

【0 8 3 6】

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、HRSPolypeptide 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。

【0 8 3 7】

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

10

20

30

40

50

0 mM NaCl および 140 mM 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 100 mM～約 300 mM 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】

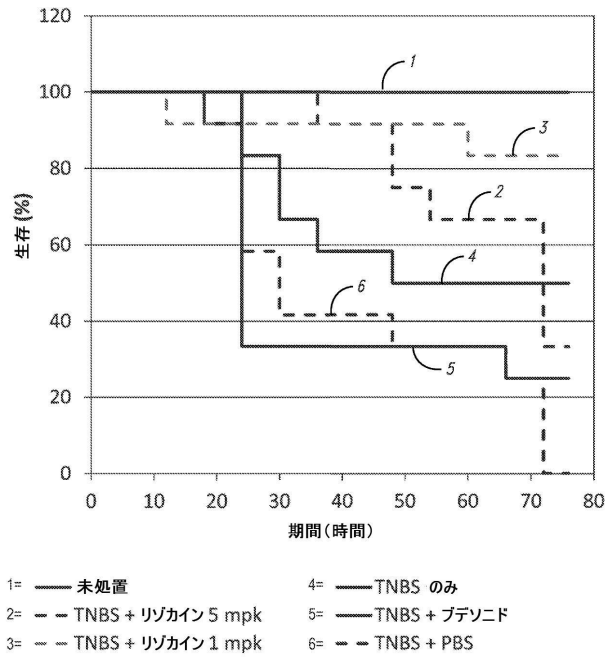


FIG. 1

【図 2】

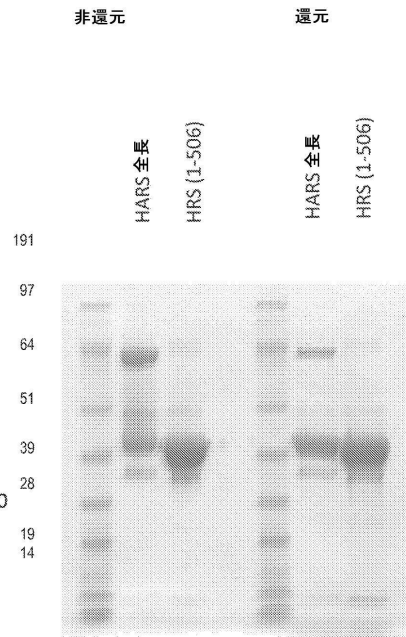


FIG. 2

【図 3】

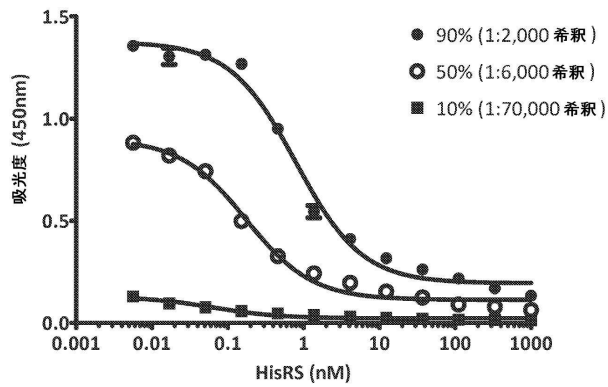


FIG. 3

【図 4】

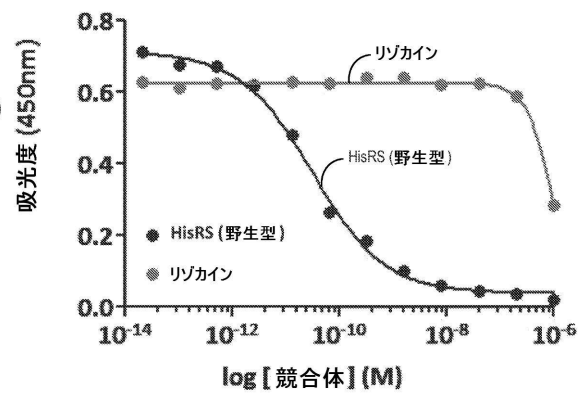


FIG. 4

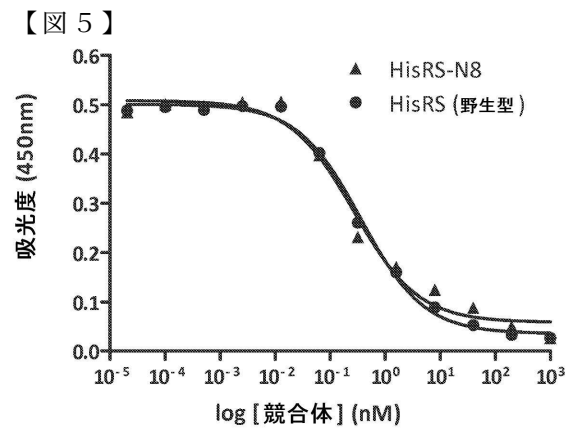


FIG. 5

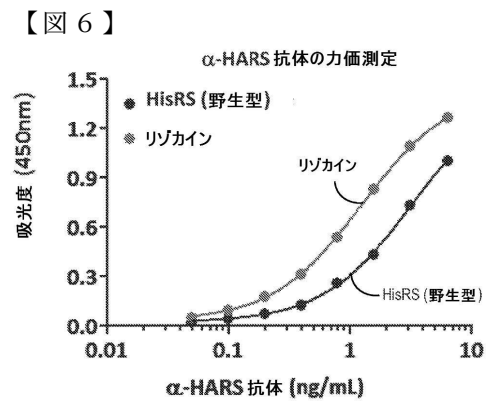


FIG. 6

【図 7】

細胞系 (C-His)	1-506	1-60, 399-506	1-60	54-506	54-410	405-506	1-410

HisRS-SVsまたはフラグメント

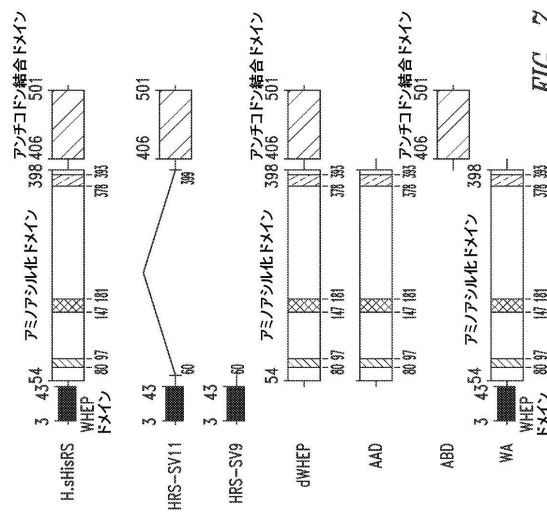


FIG. 7

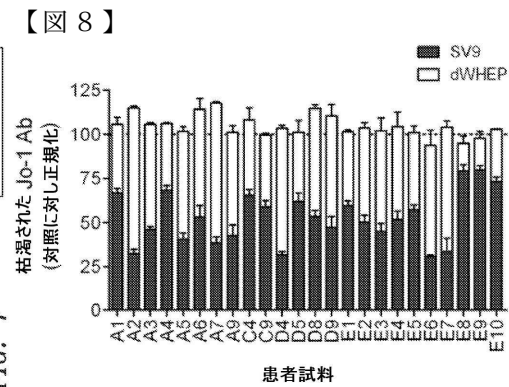
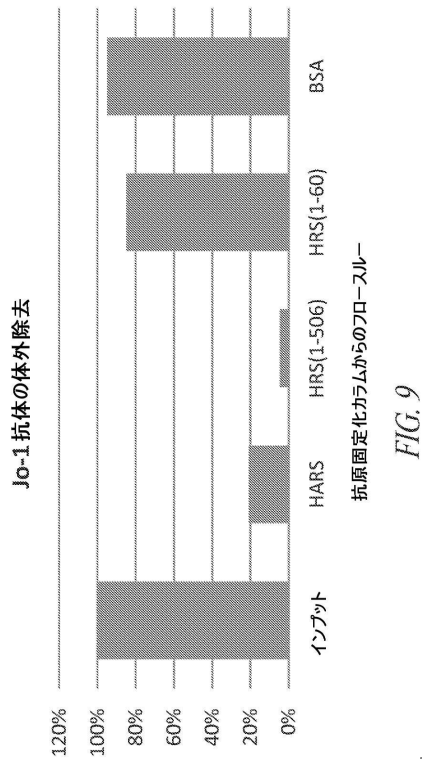


FIG. 8

【図 9】



【図 10 A】

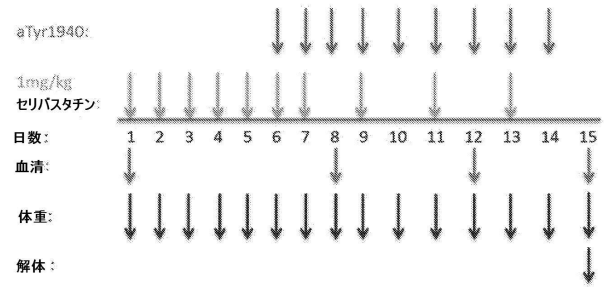


FIG. 10A

【図 10 B】

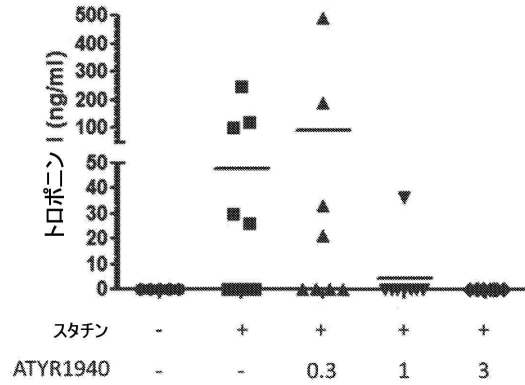


FIG. 10B

【図 11 A】

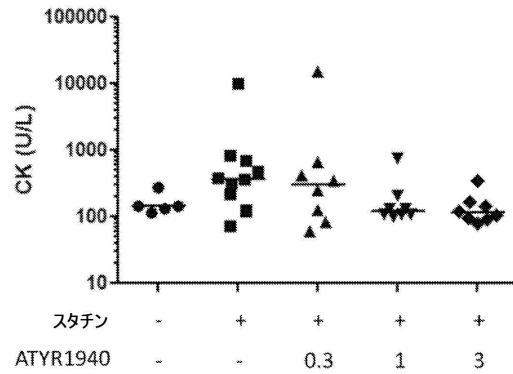


FIG. 11A

【図 12】

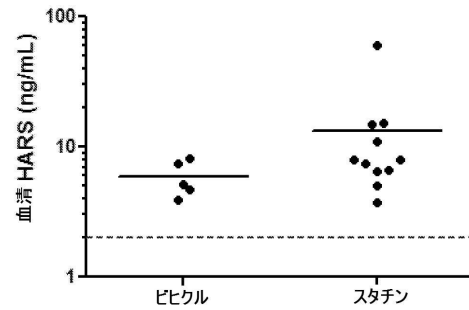


FIG. 12

【図 11 B】

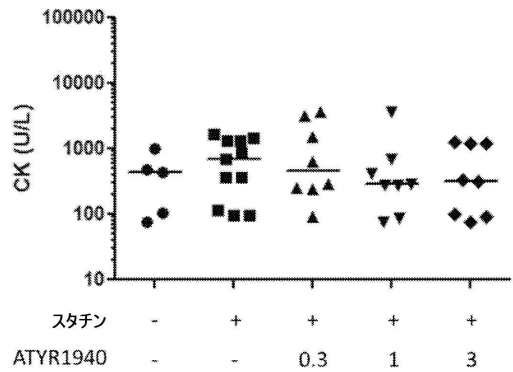


FIG. 11B

【図 13】

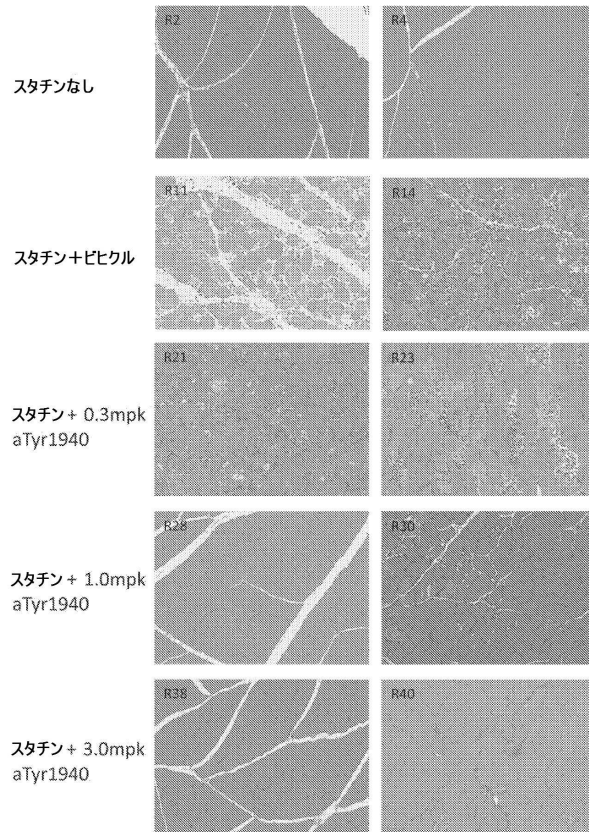


FIG. 13

【図 14】

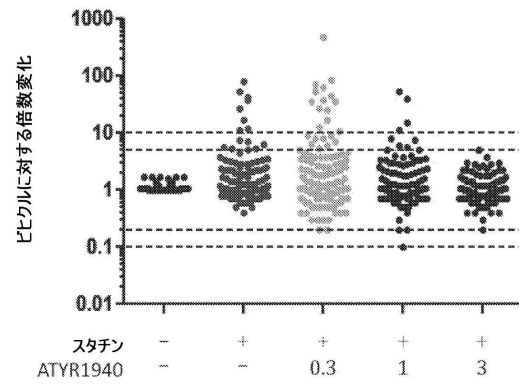


FIG. 14

【図 15 A】

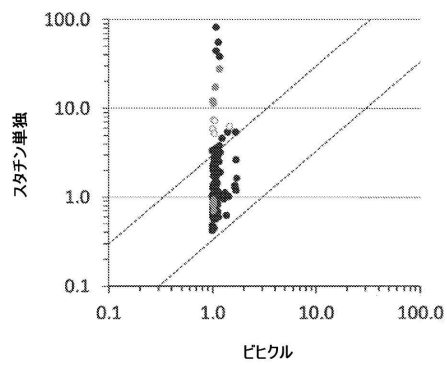


FIG. 15A

【図 15 B】

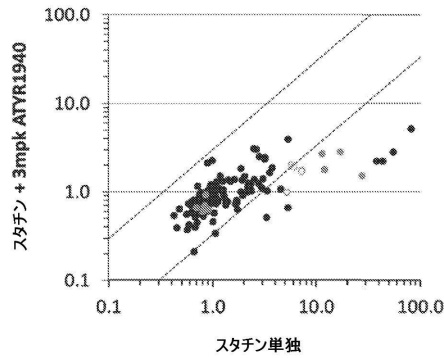


FIG. 15B

【図 16】

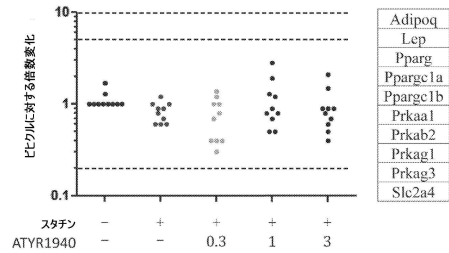


FIG. 16

【図 17】

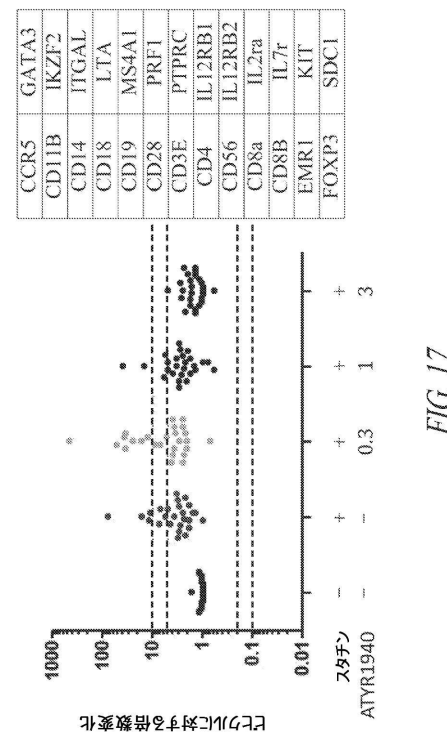


FIG. 17

【図 18 A】

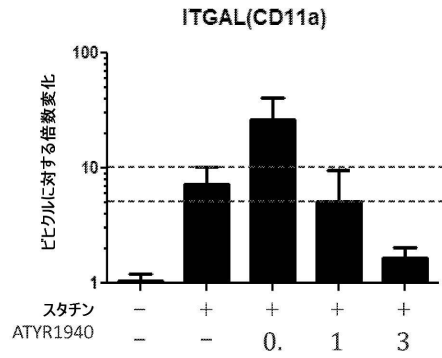


FIG. 18A

【図 18 B】

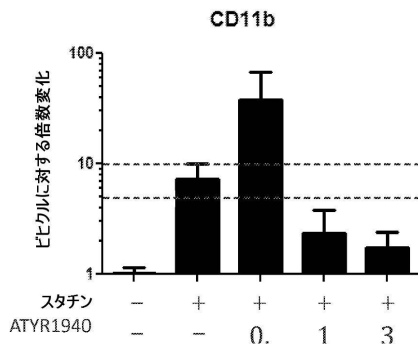


FIG. 18B

【図 19 A】

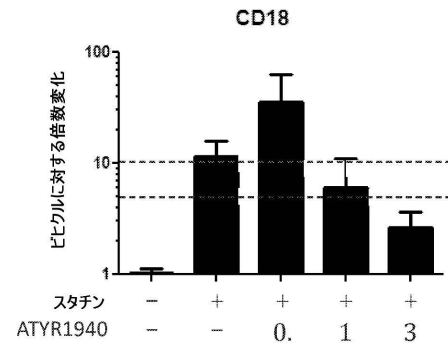


FIG. 19A

【図 19 B】

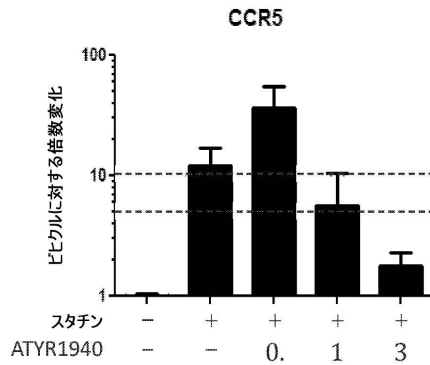


FIG. 19B

【図 18 C】

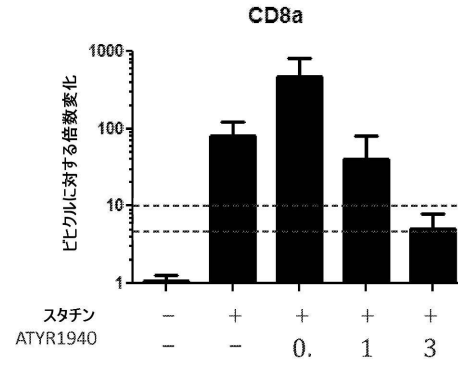


FIG. 18C

【図 18 D】

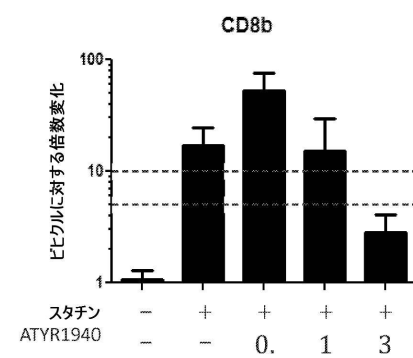


FIG. 18D

【図 19 C】

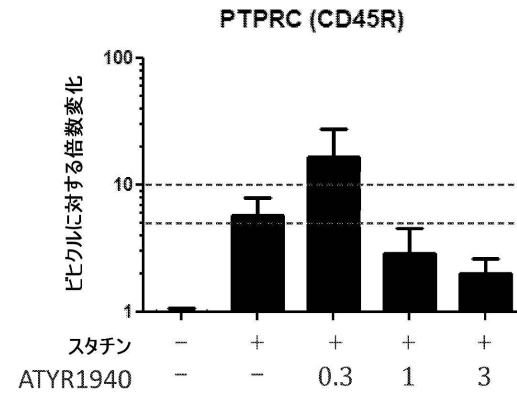


FIG. 19C

【図 20】

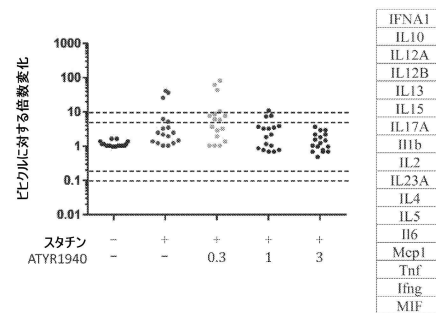


FIG. 20

【図 2 1 A】

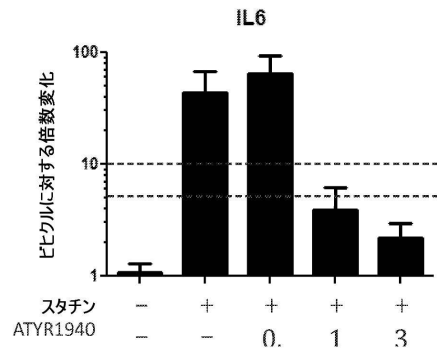


FIG. 21A

【図 2 1 B】

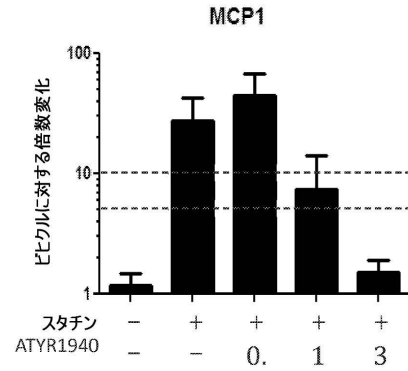


FIG. 21B

【図 2 1 C】

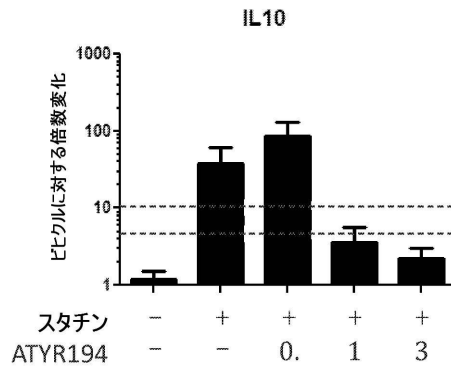


FIG. 21C

【図 2 1 D】

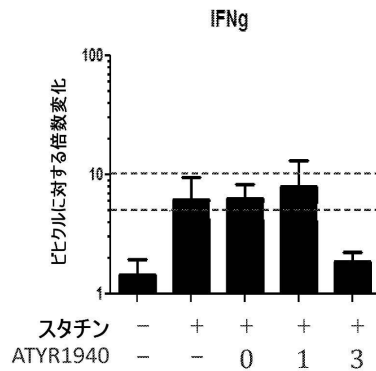


FIG. 21D

【図 2 2】

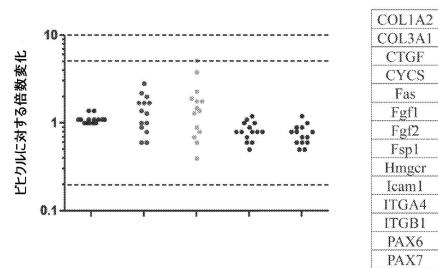
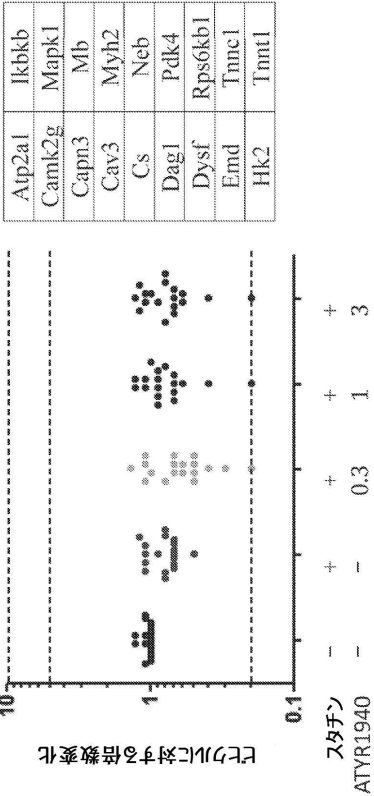


FIG. 22

【図 2 3】



【図 2 4 A】

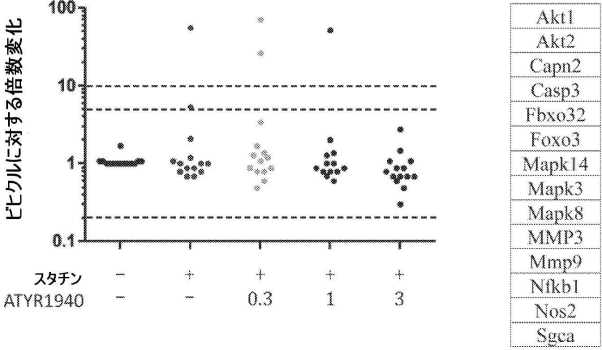
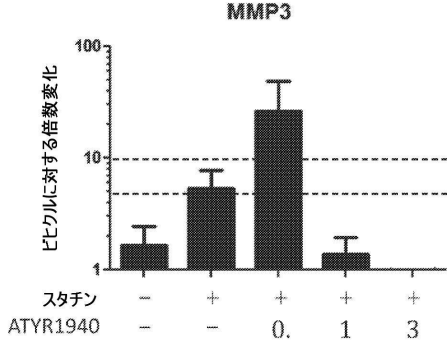
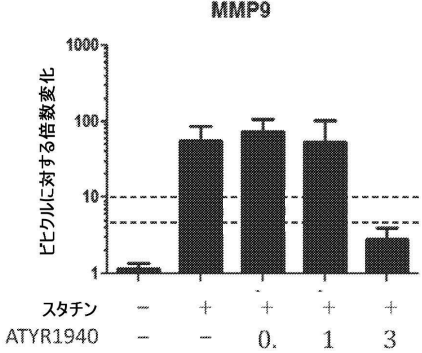


FIG. 24A

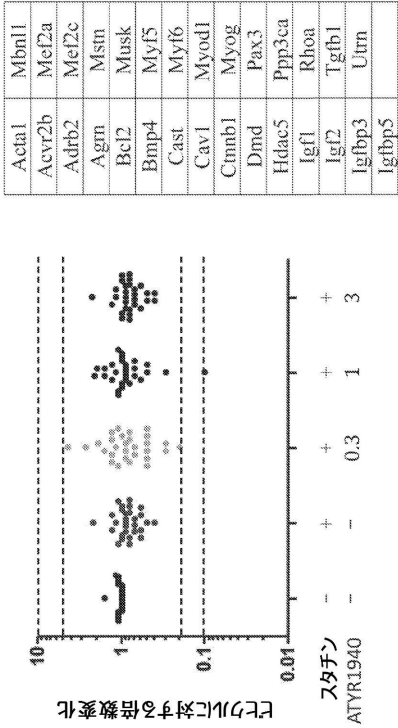
【図 2 4 B】



【図 2 4 C】



【図 2 5】



【図 2 6 B】

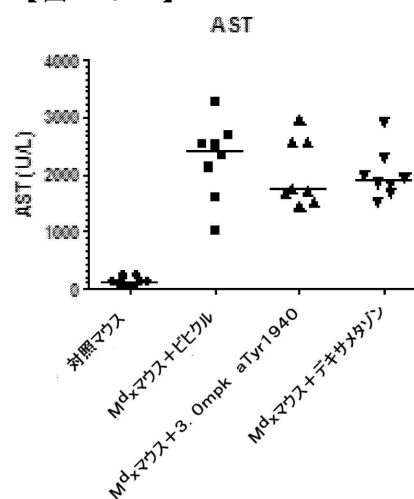


FIG. 26B

【図 2 7 A】

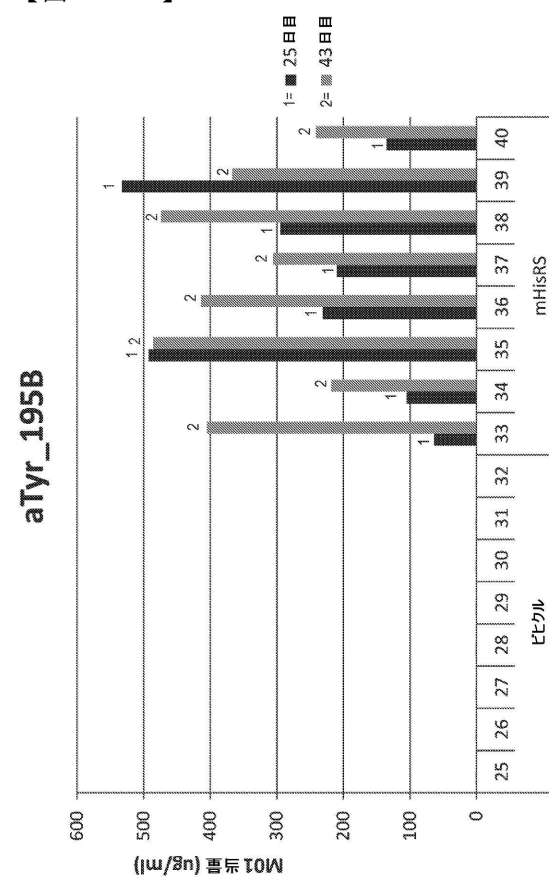
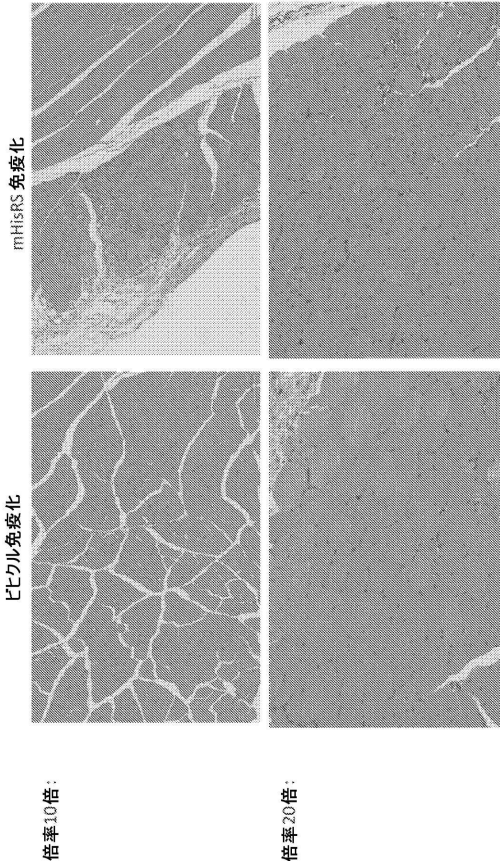


FIG. 27A

【図 2 7 B】



【図 2 8 B】

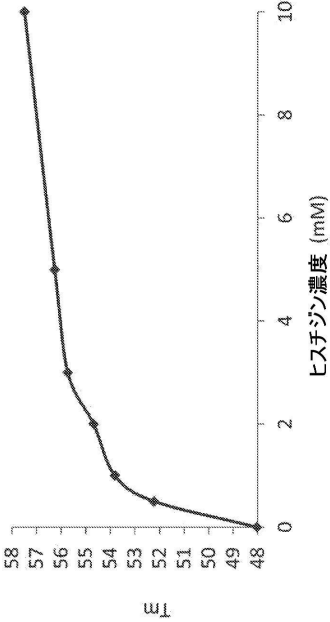
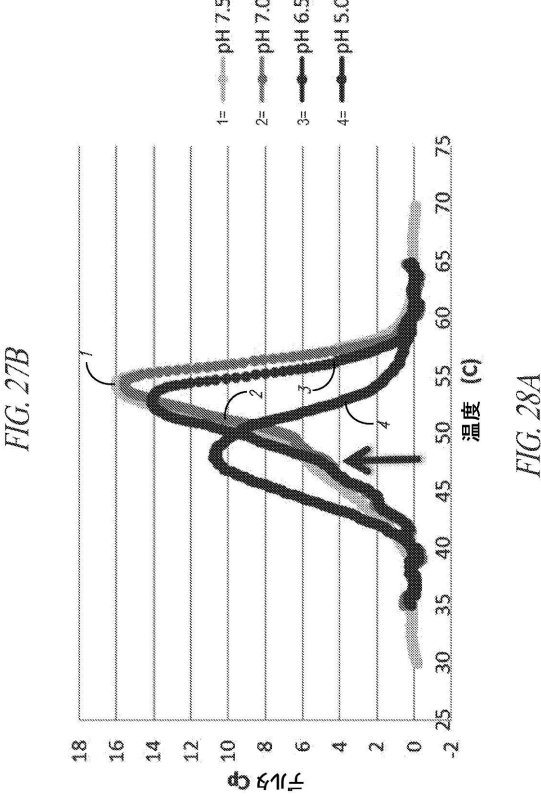


FIG. 28B

【図 2 8 A】



【配列表】

0006170077000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/20	(2006.01)	A 6 1 K 47/20	
A 6 1 K 47/04	(2006.01)	A 6 1 K 47/04	
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	D
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 9/00	(2006.01)	C 1 2 N 9/00	

(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)

(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 9 2 0 1 1, カーディフ, デバン ロード 1 6 1 5

(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 9 2 1 2 6, サンディエゴ, エージアン コート 7 5 2
9

(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 10
66
(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

審査官 小森 潔

- (56)参考文献 国際公開第2011/035335 (WO, A1)
Arthritis & Rheumatism, 2007年, Vol. 56, No. 9, p3
125-3131
人工臓器, 1983年, Vol. 12, No. 5, p895-907
人工臓器, 1983年, Vol. 22, No. 1, p194-197
人工臓器, 1995年, Vol. 24, No. 3, p788-791
(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 38/43
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	JP6170077B2	公开(公告)日	2017-07-26
申请号	JP2014557848	申请日	2013-02-15
[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		
当前申请(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 ローウィンサー 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-サー 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	A61K38/43 C12Q1/25 A61K47/26 A61K47/10 A61K47/18 A61K47/34 A61K47/20 A61K47/04 A61P21/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 A61P19/02 A61P11/00 A61K39/00 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	A61K38/43.ZNA C12Q1/25 A61K47/26 A61K47/10 A61K47/18 A61K47/34 A61K47/20 A61K47/04 A61P21/00 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00.111 A61P19/02 A61P11/00 A61K39/00.D G01N33/53.D C12N15/00.A C12N9/00		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
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	JP2015513534A JP2015513534A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本発明一般涉及包含組氨酰-tRNA合成酶多肽或其他特异性阻断剂的组合物和方法，用于治疗自身免疫疾病和其他炎性疾病，包括与Jo-1抗体相关的疾病。。一种治疗组合物，其包含长度为约20至90个氨基酸的組氨酰-tRNA合成酶 (HRS) 多肽，其与SEQ ID NO：1至少90%相同，其中所述组合物/ HRS多肽包含) 至少约95%纯度，b) 小于约5%聚集，c) 基本上不含内毒素。

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 特 許 公 報 (B2)		(11) 特許番号 特許第6170077号 (P6170077)	
(45) 発行日 平成29年7月26日 (2017. 7. 26)		(24) 登録日 平成29年7月7日 (2017. 7. 7)			
(51) Int. Cl.		F I			
A 6 1 K 38/43 (2006. 01)		A 6 1 K 38/43		Z N A	
C 1 2 Q 1/25 (2006. 01)		C 1 2 Q 1/25			
A 6 1 K 47/26 (2006. 01)		A 6 1 K 47/26			
A 6 1 K 47/10 (2006. 01)		A 6 1 K 47/10			
A 6 1 K 47/18 (2006. 01)		A 6 1 K 47/18			
請求項の数 30 (全 239 頁) 最終頁に続く					
(21) 出願番号 特願2014-557848 (P2014-557848)		(73) 特許権者 512264080			
(86) (22) 出願日 平成25年2月15日 (2013. 2. 15)		エータイアー ファーマ、 インコーポレイテッド			
(65) 公表番号 特表2015-513534 (P2015-513534A)		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			
(43) 公表日 平成27年5月14日 (2015. 5. 14)		511225594			
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/026494		バング バイオファーマ リミテッド			
(87) 国際公開番号 W02013/123432		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			
(87) 国際公開日 平成25年8月22日 (2013. 8. 22)		(74) 代理人 100102978			
審査請求日 平成28年1月29日 (2016. 1. 29)		弁理士 清水 初志			
(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)					
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					