(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-533811
(P2004-533811A)
(43)公表日　平成16年11月11日(2004.11.11)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 31/7088	A61K	31/7088		4B063
A61K 35/76	A61K	35/76		4B064
A61K 38/00	A61K	39/395	D	4B065
A61K 39/395	A61K	39/395	N	4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 164 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-566352(P2002-566352)
(86)(22)出願日　平成14年1月14日(2002.1.14)
(85)翻訳文提出日　平成15年7月10日(2003.7.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/000986
(87)国際公開番号　WO2002/066647
(87)国際公開日　平成14年8月29日(2002.8.29)
(31)優先権主張番号　60/261,442
(32)優先日　平成13年1月12日(2001.1.12)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/267,021
(32)優先日　平成13年2月6日(2001.2.6)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/270,835
(32)優先日　平成13年2月23日(2001.2.23)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　501418214
ジェネティクス　インスティテュート，エルエルシー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１４０，　ケンブリッジ，　ケンブリッジ　パーク　ドライブ　８７
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】２型サイトカインレセプターおよび２型サイトカインレセプターをコードする核酸

(57)【要約】
本発明は、単離された新規のＣＲＦ２－１２ポリヌクレオチドおよびこのＣＲＦ２－１２ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを提供する。ＣＲＦ２－１２ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体あるいはＣＲＦ２－１２ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは抗体の任意の誘導体（融合誘導体も含む）、改変体、変異体もまた、提供される。本発明はさらに、ＣＲＦ２－１２ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体が、広範囲の病理学的状態の検出および処置において、ならびに他の使用のために利用される、方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２のアミノ酸２１～６６を含むポリペプチドをコードする、単離された核酸分子、または該核酸分子の相補体。
【請求項２】
前記分子が、配列番号２または配列番号４または配列番号６のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項１に記載の核酸分子。
【請求項３】
配列番号２のアミノ酸２１～６６、または配列番号２のアミノ酸配列に対する１つ以上のアミノ酸置換を含むポリペプチドをコードする、単離された核酸分子、あるいは該核酸分子の相補体。
【請求項４】
１つ以上の前記アミノ酸置換が、保存的アミノ酸置換である、請求項３に記載の核酸分子。
【請求項５】
配列番号１２のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。
【請求項６】
前記核酸が、配列番号１１を含む、請求項５に記載の核酸分子。
【請求項７】
前記核酸が、配列番号１のヌクレオチド６２～１９７を含む、請求項１に記載の核酸分子。
【請求項８】
配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１の、少なくとも９個の連続するヌクレオチドを含む、１００未満のヌクレオチド長のオリゴヌクレオチド。
【請求項９】
請求項１に記載の核酸分子を含む、ベクター。
【請求項１０】
請求項９に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１１】
請求項１に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物。
【請求項１２】
配列番号２または配列番号１２のアミノ酸２１－６６を含む、実質的に精製されたポリペプチド。
【請求項１３】
前記ポリペプチドが、配列番号２、配列番号４、または配列番号６のアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載のポリペプチド。
【請求項１４】
非ＣＲＦ２－１２ポリペプチドに作動可能に連結した、請求項１２に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。
【請求項１５】
前記非－ＣＲＦ２－１２ポリペプチドが、免疫グロブリン分子またはＦＬＡＧエピトープのＦｃ領域、ＨＩＳタグ、およびＭＹＣタグからなる群より選択される少なくとも１つのメンバーを含む、請求項１４に記載の融合ポリペプチド。
【請求項１６】
請求項１２に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。
【請求項１７】
請求項１２に記載のポリペプチドに選択的に結合する、抗体。
【請求項１８】
１つ以上の容器中に、ＣＲＦ２－１２核酸、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドおよびＣＲＦ２

－１２ポリペプチドに対する抗体からなる群より選択される化合物を含む、キット。
【請求項１９】
ポリペプチドを生成する方法であって、該方法が、請求項１に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現を可能にする条件下で、該核酸分子を含む細胞を培養する工程を包含する、方法。
【請求項２０】
サンプル中の請求項１に記載の核酸分子の存在を検出する方法であって、該方法が、該サンプルを、該核酸分子に選択的に結合する核酸プローブまたはプライマーと接触させる工程、ならびに該核酸プローブまたはプライマーが、該サンプル中に存在する請求項１に記載の核酸分子に結合したか否かを決定する工程を包含する、方法。
【請求項２１】
サンプル中の請求項１２に記載のポリペプチドの存在を検出する方法であって、該方法が、該ポリペプチドと、該ポリペプチドと選択的に結合する化合物との間の複合体の形成を可能にする条件下で、該サンプルを該化合物と接触させる工程、および該複合体を検出する工程、それによって該複合体が存在する場合、該サンプル中の該ポリペプチドを同定する工程を包含する、方法。
【請求項２２】
請求項１２に記載のポリペプチドの活性を調節する工程であって、該方法が、該ポリペプチドを含む細胞サンプルを、該ポリペプチドに結合する、ポリペプチドの活性を調節するに十分な量の化合物と接触させる工程を包含する、方法。
【請求項２３】
生物学的サンプル中でのインターロイキン－２２の活性を調節する方法であって、該方法が、該生物学的サンプルを、該サンプル中のＩＬ－２２の活性を阻害するに十分な量の請求項１２に記載のポリペプチドと接触させる工程を包含する、方法。
【請求項２４】
前記生物学的サンプルが、インビボで提供される、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
サイトカインが媒介する免疫障害に対する活性または潜伏のモジュレーター、あるいはサイトカインが媒介する免疫障害に対する疾病素質についてスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下：
試験化合物を請求項１２に記載のポリペプチドと接触させる工程；および
該試験化合物が該ポリペプチドに結合するかどうかを決定する工程、
を包含し、ここで、該試験化合物の該ポリペプチドへの結合は、試験化合物が、サイトカインが媒介する免疫障害に対する活性または潜伏のモジュレーター、あるいはサイトカインが媒介する免疫障害に対する疾病素質であることを示す、方法。
【請求項２６】
サイトカインが媒介する免疫障害に対する活性または潜伏のモジュレーター、あるいはサイトカインが媒介する免疫障害に対する疾病素質についてスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下：
試験化合物を、該免疫障害に罹患している試験動物または該免疫障害に対する危険性の増加した試験動物に投与する工程であって、ここで該試験動物が、請求項１に記載の核酸配列によってコードされるポリペプチドを組換え的に発現する、工程；
該試験動物における該ポリペプチドの活性の発現を測定する工程；
コントロール動物における該ポリペプチドの活性を測定する工程であって、ここで該コントロール動物が、該ポリペプチドを組換え的に発現し、かつ該免疫障害に対する危険性が増加していない、工程；および
該試験動物および該コントロール動物における該ポリペプチドの発現を比較する工程
を包含し、
ここで、該コントロール動物に対する、該試験動物における該ポリペプチドの活性における変化は、該試験化合物が該免疫障害の潜伏のモジュレーターであることを示し、そして

ここで、該サイトカインが媒介する免疫障害は、自己免疫障害、Ｔリンパ球関連障害、細胞増殖障害、免疫分化障害、および免疫不全障害からなる群より選択される、
方法。
【請求項２７】
請求項２６に記載の方法であって、ここで前記試験動物が、組み換え試験動物であり、該試験動物は、試験タンパク質導入遺伝子を発現するか、またはプロモーターの制御下で該導入遺伝子を、野生型試験動物に対して増加したレベルで発現し、ここで、該プロモーターが、該導入遺伝子のネイティブの遺伝子プロモーターではない、方法。
【請求項２８】
被験体における、請求項１２に記載のポリペプチドの変化したレベルに関連する疾患に対する疾病素質の存在を決定するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）該被験体由来のサンプル中の該ポリペプチドの量を定量する工程；および
ｂ）工程（ａ）での該ポリペプチドの量を、コントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程、
を包含し、ここで、該コントロールサンプル中の該ポリペプチドのレベルと比較する場合、工程（ａ）での該ポリペプチドのレベルの変化は、該被験体における該疾患に対する該疾病素質の存在を示す、方法。
【請求項２９】
前記被験体が、ヒトである、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
被験体における、請求項１に記載の核酸分子の変化したレベルに関連する疾患に対する疾病素質の存在を決定するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）該被験体由来のサンプル中の該核酸の量を定量する工程；および
ｂ）工程（ａ）での該核酸の量を、コントロールサンプル中に存在する該核酸の量と比較する工程、
を包含し、ここで、該コントロールサンプル中の該核酸レベルと比較する場合、工程（ａ）での該核酸のレベルの変化は、該被験体における該疾患に対する該疾病素質の存在を示す、方法。
【請求項３１】
前記被験体が、ヒトである、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
サイトカインが媒介する障害に関連する病理学的状態を処置または予防するための方法であって、該方法が、請求項１２に記載のポリペプチドを、病理学的状態を緩和または予防するために十分な量で、被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項３３】
前記被験体が、ヒトである、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
免疫障害に関連する病理学的状態を処置または予防するための方法であって、該方法が、請求項１に記載の核酸を、病理学的状態を処置または予防するために十分な量で、被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項３５】
前記被験体が、ヒトである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
病理学的状態を処置または予防するための方法であって、該方法が、請求項１６に記載の抗体を、病理学的状態を緩和するかまたは予防するために十分な量で、被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項３７】
前記被験体が、ヒトである、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
被験体において、慢性関節リウマチを処置する方法であって、該方法が、該被検体におけ

るＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を調節する薬剤を、該被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項３９】
前記薬剤が、ＣＲＦ２－１２核酸またはＣＲＦ２－１２ポリペプチドである、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記被験体が、ヒトである、請求項３８に記載の方法。
【請求項４１】
前記薬剤が、前記被検体における前記ＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を増加させる、請求項３８に記載の方法。
【請求項４２】
前記薬剤が、前記被検体における前記ＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を減少させる、請求項３８に記載の方法。
【請求項４３】
前記薬剤が、抗ＣＲＦ２－１２抗体である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
被験体において、多発性硬化症を処置する方法であって、該方法が、該被検体におけるＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を調節する薬剤を、該被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項４５】
前記薬剤が、ＣＲＦ２－１２核酸またはＣＲＦ２－１２ポリペプチドである、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記被験体が、ヒトである、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
前記薬剤が、前記被検体における前記ＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を増加させる、請求項４４に記載の方法。
【請求項４８】
前記薬剤が、前記被検体における前記ＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を減少させる、請求項４４に記載の方法。
【請求項４９】
前記薬剤が、抗ＣＲＦ２－１２抗体である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
血管平滑筋細胞の増殖を調節する方法であって、該方法が、血管平滑筋細胞を、該細胞におけるＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を調節する薬剤と接触させる工程を包含する、方法。
【請求項５１】
前記薬剤が、ＣＲＦ２－１２核酸またはＣＲＦ２－１２ポリペプチドである、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記薬剤が、前記血管平滑筋細胞における前記ＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を増加させる、請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
前記薬剤が、前記血管平滑筋細胞における前記ＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を減少させる、請求項５０に記載の方法。
【請求項５４】
前記薬剤が、抗ＣＲＦ２－１２抗体である、請求項５０に記載の方法。
【請求項５５】
前記細胞が、被験体においてインビボで提供される、請求項５０に記載の方法。
【請求項５６】

前記被験体が、ヒトである、請求項５０に記載の方法。
【請求項５７】
被験体において、炎症を処置または予防する方法であって、該方法が、該被検体におけるＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を調節する薬剤を、該被験体に投与する工程を包含する、方法。
【請求項５８】
前記被験体が、ヒトである、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記薬剤が、前記被検体におけるＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を増加させる、請求項５７に記載の方法。
【請求項６０】
前記薬剤が、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドである、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
前記薬剤が、ＣＲＦ２－１２核酸である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６２】
前記薬剤が、前記被検体におけるＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を減少させる、請求項５７に記載の方法。
【請求項６３】
前記薬剤が、ＣＲＦ２－１２抗体である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記薬剤が、ＣＲＦ２－１２アンチセンス核酸である、請求項６２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（発明の分野）
本発明は、一般に、核酸およびポリペプチドに関し、より詳細には、ＩＩ型サイトカインレセプターおよび２型サイトカインレセプターの細胞外対応物をコードする核酸およびポリペプチド、ならびにこのポリペプチドおよびポリヌクレオチドを産生するためのベクター、宿主細胞、抗体、および組換え方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
サイトカインは、多くの細胞型の増殖および分化に影響を与える可溶性タンパク質である。これらのレセプターは、１つ以上の内在性膜タンパク質からなり、これらのレセプターは、このサイトカインに高親和性で結合し、そして特定のレセプターサブユニットの細胞質部分を介してこの細胞への結合事象を伝達する。サイトカインレセプターは、これらの細胞外リガンド結合ドメインの類似性に基づきいくつかのクラスに分類されてきた。例えば、インターフェロン（ＩＦＮ）の結合および／またはその効果の伝達を担うレセプター鎖は、２型サイトカインレセプターファミリー（ＣＲＦ２）のメンバーであり、これらは、特徴的な２００～２５０残基の細胞外ドメインに基づく。インビボで示されたこれらのインターフェロンの活性は、他のサイトカイン、サイトカインアゴニスト、およびサイトカインアンタゴニストの臨床的な潜在能力を示し、そしてそれらを必要とする。
【０００３】
ＣＲＦ２ファミリーのメンバーが、種々のサイトカイン（インターフェロンα、インターフェロンβ、インターフェロンγ、ＩＬ－１０、ＩＬ－２０、およびＩＬ－２２を含む）のレセプターとして作用することが、報告されている。最近同定されたＣＲＦ２ファミリーのメンバーは、ＩＬ－１０様分子であるＩＬ－１９、ＡＫ１５５およびｍｄａ－７についての候補リガンドである。
【発明の開示】
【課題を解決するための手段】

【０００４】
（発明の要旨）
本発明は、ＣＲＦ２ファミリーの新規メンバーをコードするポリヌクレオチド配列の発見に一部基づく。
【０００５】
従って、１つの局面において、本発明は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、もしくは配列番号１１の配列、またはそれらのフラグメント、ホモログ、または誘導体を含む単離された核酸分子を提供する。この核酸としては、例えば、配列番号２、、配列番号４、配列番号６、または配列番号１２のアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも７０％（例えば、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％以上）同一なポリペプチドをコードする核酸配列を含み得る。核酸は、例えば、ゲノムＤＮＡフラグメント、またはｃＤＮＡ分子であり得る。
【０００６】
いくつかの実施形態において、この核酸は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１を含む配列の５’側に５ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、５００ヌクレオチド、７５０ヌクレオチド、１０００ヌクレオチド、または１５００ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、この核酸は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１を含む配列の３’側に５ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、５００ヌクレオチド、７５０ヌクレオチド、１０００ヌクレオチド、または１５００ヌクレオチドを含む。他の実施形態において、この核酸は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１を含む配列の５’側および３’側に５ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、５００ヌクレオチド、７５０ヌクレオチド、１０００ヌクレオチド、または１５００ヌクレオチドを含む。
【０００７】
配列番号２のアミノ酸配列２１～６６を含むポリペプチドをコードする核酸（例えば、配列番号１の核酸６２～１９７）もまた、本発明の範囲内にある。そのような核酸分子の例としては、配列番号２、配列番号４、配列番号６のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、配列番号１、配列番号３、または配列番号５を含む核酸配列）が挙げられる。
【０００８】
いくつかの実施形態において、本発明のＣＲＦ２－１２核酸は、ポリペプチドをコードし、この核酸は、以下のポリペプチド配列の１つ以上を含むポリペプチドをコードする：ＭＭＰＫＨＣＬ／ＦＬＧＬ／ＦＬＩ（配列番号１３）、ＦＱＳＲＮＦＨＮＩＬＨ／ＱＷＱＡ／ＰＧ（配列番号１４）、ＳＩ／ＶＹＦＶＱＹＫＭ／ＩＹＧＱＳ／ＲＱＷ（配列番号１５）、ＴＰＲＦＴＰＷＷＥＴＫＬ／ＩＤＰＰＶ（配列番号１６）、ＬＶ／ＬＹＲＶＦＴ／ＩＩＮＮＳＬＥＫＥＱＫＡ／ＶＹＥＧ（配列番号１７）、ＲＡＶＥＩＥＧ／ＡＬＩ／ＴＰＨＳＳＹＣＶＶＡＥＭ／ＩＹＱＰＭ（配列番号１８）、およびＤＲＲＳＰ／ＱＲＳＫ／ＥＥＲＣＶＱ／ＥＩＰ（配列番号１９）。
【０００９】
いくつかの実施形態において、この核酸は、配列番号２のアミノ酸配列２１～６６を含むポリペプチドをコードする配列の５’側に、５ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、５００ヌクレオチド、７５０ヌクレオチド、１０００ヌクレオチド、または１５００ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、この核酸は、配列番号２のアミノ酸２１～６６をコードする配列の３’側に、５ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌク

レオチド、１５０ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、５００ヌクレオチド、７５０ヌクレオチド、１０００ヌクレオチド、または１５００ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、この核酸は、配列番号２のアミノ酸２１～６６をコードする配列の５’側および３’側に、５ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、１５０ヌクレオチド、２５０ヌクレオチド、５００ヌクレオチド、７５０ヌクレオチド、１０００ヌクレオチド、または１５００ヌクレオチドを含む。

【００１０】

本明細書中に記載される１つ以上の核酸を含むベクター、およびこのベクターまたは本明細書中に記載される核酸を含む細胞もまた本発明に含まれる。

【００１１】

本発明はまた、任意の上記の核酸分子を含むベクターを用いて形質転換された宿主細胞に関する。

【００１２】

別の局面において、本発明は、ＣＲＦ２－１２核酸および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む。

【００１３】

さらなる局面において、本発明は、実質的に精製されたＣＲＦ２－１２ポリペプチド（例えば、ＣＲＦ２－１２核酸によってコードされる任意のＣＲＦ２－１２ポリペプチド）ならびにそれらのフラグメント、ホモログ、アナログ、および誘導体を含む。本発明はまた、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドならびに薬学的に受容可能なキャリアおよび希釈剤を含む薬学的組成物を含む。

【００１４】

なおさらなる局面において、本発明は、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。この抗体は、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、ならびにそれらのフラグメント、ホモログ、アナログ、および誘導体であり得る。本発明はまた、ＣＲＦ２－１２抗体ならびに薬学的に受容可能なキャリアおよび希釈剤を含む薬学的組成物を含む。本発明はまた、上記の任意の核酸分子によってコードされるポリペプチド上のエピトープに結合する単離された抗体に関する。

【００１５】

本発明はまた、上記の任意の薬学的組成物を備えるキットを含む。

【００１６】

本発明は、ＣＲＦ２－１２核酸（例えば、ＣＲＦ２－１２核酸を含むベクター）を含む細胞を提供する工程、およびこの核酸によってコードされるＣＲＦ２－１２ポリペプチドを発現するのに十分な条件下で、この細胞を培養する工程によって、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドを産生する方法をさらに提供する。次いで、この発現されたＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、この細胞から回収される。好ましくは、この細胞は、内因性ＣＲＦ２－１２ポリペプチドをほとんど産生しないか、または全く産生しない。この細胞は、例えば、原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。

【００１７】

本発明はまた、サンプルと、このポリペプチドまたは核酸に特異的に結合する化合物とを接触させる工程、および存在する場合に複合体形成を検出する工程によって、サンプル中のＣＲＦ２－１２ポリペプチドまたはＣＲＦ２－１２核酸を同定する方法に関する。

【００１８】

本発明は、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドと化合物とを接触させる工程、およびこのＣＲＦ２－１２ポリペプチド活性が改変されたか否かを決定する工程によって、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法をさらに提供する。

【００１９】

本発明はまた、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドと化合物とを接触させる工程およびこの化合物がこのＣＲＦ２－１２ポリペプチドの活性を改変するか、このＣＲＦ２－１２ポリペプ

チドに結合するか、またはＣＲＦ２－１２ポリペプチドをコードする核酸分子に結合するか否かを決定する工程によって同定される、ＣＲＦ２－１２ポリペプチド活性を調節する化合物に関する。

【００２０】

別の局面において、本発明は、被験体中のＣＲＦ２－１２関連障害の存在または素因（疾病素質）を決定する方法を提供する。この方法は、被験体からサンプルを提供する工程、および被験体サンプル中のＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量を測定する工程を包含する。次いで被験体サンプル中のＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量は、コントロールサンプル中のＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量と比較される。コントロールタンパク質サンプル中のＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量と比較した被験体タンパク質サンプル中のＣＲＦ２－１２ポリペプチドの量の変化は、この被験体が組織増殖関連状態を有することを示す。好ましくは、コントロールサンプルは、マッチする個体であるが（すなわち、年齢、性別、または他の一般的な条件が類似する）、組織増殖関連状態を有する疑いがない個体から取り出され得る。あるいは、被験体が組織増殖関連障害に罹患しているという疑いがない時点で、このコントロールサンプルは、被験体から取り出され得る。いくつかの実施形態において、このＣＲＦ２－１２は、ＣＲＦ２－１２抗体を用いて検出される。

【００２１】

さらなる局面において、本発明は、被験体のＣＲＦ２－１２関連障害の存在または素因を決定する方法を提供する。この方法は、被験体から核酸サンプル（例えば、ＲＮＡもしくはＤＮＡ、またはそれらの両方）を提供する工程、および被験体核酸サンプル中のＣＲＦ２－１２核酸の量を測定する工程を包含する。次いで、被験体核酸中のＣＲＦ２－１２核酸サンプルの量は、コントロールサンプル中のＣＲＦ２－１２核酸の量と比較される。コントロールサンプル中のＣＲＦ２－１２の量と比較した、このサンプル中のＣＲＦ２－１２核酸の量の変化は、この被験体が、組織増殖関連障害を有することを示す。

【００２２】

なおさらなる局面において、本発明は、ＣＲＦ２－１２関連障害を処置または予防または遅延する方法を提供する。この方法は、そのような処置または予防または遅延が所望される被験体に、被験体の組織増殖関連障害を処置、予防、または遅延するのに十分な量のＣＲＦ２－１２核酸、ＣＲＦ２－１２ポリペプチド、またはＣＲＦ２－１２抗体を投与する工程を包含する。そのような障害の例としては、慢性関節リウマチおよび多発性硬化症が挙げられる。

【００２３】

他に示されない限り、本明細書中に使用される全ての専門用語および科学用語は、本発明の属する分野における当業者に一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似するかまたは等価な方法または材料が、本発明の実施または試験に用いられ得るが、適切な方法および材料は、以下に記載される。本明細書中に言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参照文献は、本明細書中でその全体が参考として援用される。矛盾する場合、定義を含む本明細書が支配する。さらに、材料、方法、および実施例は、例示的のみであり、限定することを意図しない。

【００２４】

本発明の他の形態および利点は、以下の発明の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【００２５】

（発明の詳細な説明）

本発明は、ＣＲＦ２ポリペプチドとの相同性を示すポリペプチドをコードする新規核酸配列の発見に、一部基づく。可溶性ＣＲＦ２様ポリペプチドをコードする６９６ヌクレオチドの配列（表１；配列番号１を参照のこと）は、本発明に含まれる。そのコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、表２（配列番号２）に示される。予想されるオープンリーディングフレームは、２３１アミノ酸長の分泌タンパク質をコードする。

【００２６】

【表１】

表１

ATGATGCCTAAACATTGCTTTCTAGGCTTCCTCATCAGTTTCTTCCTTACTGGTGTAGCA

GGAACTCAGTCAACGCATGAGTCTCTGAAGCCTCAGAGGGTACAATTTCAGTCCCGAAAT

TTTCACAACATTTTGCAATGGCAGCCTGGGAGGGCACTTACTGGCAACAGCAGTGTCTAT

TTTGTGCAGTACAAAATATATGGACAGAGACAATGGAAAAATAAAGAAGACTGTTGGGGT

ACTCAAGAACTCTCTTGTGACCTTACCAGTGAAACCTCAGACATACAGGAACCTTATTAC

GGGAGGGTGAGGGCGGCCTCGGCTGGGAGCTACTCAGAATGGAGCATGACGCCGCGGTTC

ACTCCCTGGTGGGAAACAAAAATAGATCCTCCAGTCATGAATATAACCCAAGTCAATGGC

TCTTTGTTGGTAATTCTCCATGCTCCAAATTTACCATATAGATACCAAAAGGAAAAAAAT

GTATCTATAGAAGATTACTATGAACTACTATACCGAGTTTTTATAATTAACAATTCACTA

GAAAAGGAGCAAAAGGTTTATGAAGGGGCTCACAGAGCGGTTGAAATTGAAGCTCTAACA

CCACACTCCAGCTACTGTGTAGTGGCTGAAATATATCAGCCCATGTTAGACAGAAGAAGT

CAGAGAAGTGAAGAGAGATGTGTGGAAATTCCATGA (配列番号 :1)

【００２７】

【表２】

表 2

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVY

FVQYKIYGQRQWKNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRF

TPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLVILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSL

EKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPMLDRRSQRSEERCVEIP

(配列番号 2)

【００２８】

可溶性ＣＲＦ２様ポリペプチドをコードする７９２ヌクレオチドの配列（表３；配列番号３を参照のこと）もまた本発明に含まれる。理論に束縛されることを望まないが、表３のヌクレオチド配列は、表１のヌクレオチド配列もまたコードするＣＲＦ２－１２遺伝子から転写されたＲＮＡの選択的スプライシングの結果であると考えられる。表３のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を表４（配列番号４）に示す。予想されるオープンリーディングフレームは、２６３アミノ酸長の分泌タンパク質をコードする。表３のヌクレオチド配列は、表１に示されるヌクレオチド配列と比較して９６ヌクレオチドの過剰なエキソン（ｅｘｔｒａ ｅｘｏｎ）を有する。この過剰なエキソンは、表２に示されるポリペプチド配列中に存在しない３２アミノ酸を含むポリペプチドをコードする。

【００２９】

【表３】

表 3

ATGATGCCTAAACATTGCTTTCTAGGCTTCCTCATCAGTTTCTTCCTTACTGGTGTAGC

AGGAACTCAGTCAACGCATGAGTCTCTGAAGCCTCAGAGGGTACAATTTCAGTCCCGAA

ATTTTCACAACATTTTGCAATGGCAGCCTGGGAGGGCACTTACTGGCAACAGCAGTGTC

TATTTTGTGCAGTACAAAATCATGTTCTCATGCAGCATGAAAAGCTCTCACCAGAAGCC

AAGTGGATGCTGGCAGCACATTTCTTGTAACTTCCCAGGCTGCAGAACATTGGCTAAAT

ATGGACAGAGACAATGGAAAAATAAAGAAGACTGTTGGGGTACTCAAGAACTCTCTTGT

GACCTTACCAGTGAAACCTCAGACATACAGGAACCTTATTACGGGAGGGTGAGGGCGGC

CTCGGCTGGGAGCTACTCAGAATGGAGCATGACGCCGCGGTTCACTCCCTGGTGGGAAA

CAAAAATAGATCCTCCAGTCATGAATATAACCCAAGTCAATGGCTCTTTGTTGGTAATT

CTCCATGCTCCAAATTTACCATATAGATACCAAAAGGAAAAAAATGTATCTATAGAAGA

TTACTATGAACTACTATACCGAGTTTTTATAATTAACAATTCACTAGAAAAGGAGCAAA

AGGTTTATGAAGGGGCTCACAGAGCGGTTGAAATTGAAGCTCTAACACCACACTCCAGC

TACTGTGTAGTGGCTGAAATATATCAGCCCATGTTAGACAGAAGAAGTCAGAGAAGTGA

AGAGAGATGTGTGGAAATTCCATGA (配列番号 :3)

【００３０】

【表４】

表 4

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSV

YFVQYKIMFSCSMKSSHQKPSGCWQHISCNFPGCRTLAKYGQRQWKNKEDCWGTQELSC

DLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLVI

LHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSS

YCVVAEIYQPMLDRRSQRSEERCVEIP (配列番号 4)

【００３１】

表５に示される核酸もまた、本発明の範囲内にある。理論に束縛されることを望まないが、表５のヌクレオチド配列は、表１および表３のヌクレオチド配列もまたコードするＣＲＦ２－１２遺伝子から転写されたＲＮＡの選択的スプライシングの結果であると考えられる。この開示された核酸は、表６に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。１つのエキソンを飛び越し、最後のエキソンにおいて翻訳のフレームを変化する選択的スプライシングの結果として、表６に示されるアミノ酸配列は、表２のタンパク質配列より短く、そのカルボキシ末端に独特のアミノ酸を有する。

【００３２】

【表５】

表５

ATGATGCCTAAACATTGCTTTCTAGGCTTCCTCATCAGTTTCTTCCTTACTGGTGTAGCAGGAACT
CAGTCAACGCATGAGTCTCTGAAGCCTCAGAGGGTACAATTTCAGTCCCGAAATTTTCACAACATT
TTGCAATGGCAGCCTGGGAGGGCACTTACTGGCAACAGCAGTGTCTATTTTGTGCAGTACAAAATA
TATGGACAGAGACAATGGAAAAATAAAGAAGACTGTTGGGGTACTCAAGAACTCTCTTGTGACCTT
ACCAGTGAAACCTCAGACATACAGGAACCTTATTACGGGAGGGTGAGGGCGGCCTCGGCTGGGAGC
TACTCAGAATGGAGCATGACGCCGCGGTTCACTCCCTGGTGGGAAAGAGCAAAAGGTTTATGA
(配列番号　:5)

【００３３】
【表６】

表 6

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKI
YGQRQWKNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWERAKGL
(配列番号　:6)

【００３４】
本発明のＣＲＦ２様核酸およびＣＲＦ２様ポリペプチド（表１～６に示される核酸およびポリペプチドを含む）は、「ＣＲＦ２－１２」核酸および「ＣＲＦ２－１２」ポリペプチドとして本明細書中で称される。
【００３５】
３つの開示された「ＣＲＦ２－１２」核酸およびコードされるポリペプチドは、ＣＲＦ２－１２遺伝子中の２つの推定のエキソンに対応する共通の配列を共有する。１つは、配列番号１のエキソン１～６１に対応するエキソンを含む。第２のエキソンは、配列番号１のヌクレオチド６２～１９７に対応する。これらの配列は、全ての開示されたＣＲＦ２－１２核酸配列中に存在する。従って、ＣＲＦ２－１２核酸は、これらのエキソンのうちの１つまたは両方を含み得、そしてＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、これらのエキソンの１つまたは両方によってコードされるポリペプチド配列を含み得る。例えば、配列番号２のアミノ酸２１～６６と相同な配列を含むポリペプチドをコードするＣＲＦ２－１２核酸（例えば、配列番号１のヌクレオチド６２～１９７を含む核酸）は、本発明中に含まれる。配列番号２のアミノ酸２１～６６と相同な配列を含むポリペプチドもまた、本発明の範囲内である。配列番号２のアミノ酸１～６１と相同な配列を含むポリペプチドをコードするＣＲＦ２－１２核酸（例えば、配列番号１のヌクレオチド１～６１を含む核酸）もまた、本発明に含まれ得る。配列番号２のアミノ酸１～６１と相同な配列を含むポリペプチドもまた、本発明の範囲内にある。
【００３６】
表１および表２に開示される配列は、ＩＩ型サイトカインレセプターファミリータンパク質のために構築されたＨｉｄｄｅｎ　Ｍａｒｋｏｖモデル（ＨＭＭ）を用いて同定された。次いで、このＨＭＭモデルは、タンパク質データベースおよび核酸データベースを検索するために用いられた。表１に示される核酸は、編集された配列に基づきアセンブルされた。
【００３７】
表１に示される核酸配列に対応するｃＤＮＡは、ＰＣＲ増幅を用いて同定された。用いたＰＣＲプライマーは、５’ＣＴＴＧＣＡＡＣＣＡＴＧＡＴＧＣＣＴＡＡＡＣＡＴＴＧＣ（配列番号５）またはＡＴＧＡＴＧＣＣＴＡＡＡＣＡＴＴＧＣＴＴＴＣＴＡＧＧ（配列番号６）および３’（ＴＣＡＴＧＧＡＡＴＴＴＣＣＡＣＡＣＡＴＣＴＣＴＴＴＣＡＣ）（配列番号７）を含んだ。
【００３８】

このプライマーを使用して、ｃＤＮＡライブラリーからｃＤＮＡ種を増幅した。ライブラリーを調製するために使用されたＲＮＡを、ＰＨＡおよびＰＭＡで活性化された混合リンパ球培養物から単離した。約７００～７５０ｂｐの大部分の種を、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ＰＣＲキットを使用して、５つの別々のＰＣＲ反応より４０サイクル後に獲得した。これらの５つのフラグメントを、Ｓｉｇｍａ ＧｅｎＥｌｕｔｅ Ｍｉｎｕｓ ＥｔＢｒ Ｓｐｉｎ Ｃｏｌｕｍｎｓを使用して、分離用アガロースゲルから精製した。引き続き、これらフラグメントをＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＴＡクローニングキットを使用して、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのベクターｐＣＲ２．１にライゲーションした。Ｘ－ｇａｌスクリーニングと組み合わされたＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＴＯＰＯ １０ Ｏｎｅ Ｓｈｏｔ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎを使用して、白色の形質転換体を獲得した。３０個の白色コロニーを採取して（元の「ＰＣＲ反応」に対応する各々の形質転換から６個のコロニー）、アンピシリンを補充したＬＢ中で一晩培養した。４．５ｍｌの細胞培養物についてＱｉａｇｅｎ Ｓｐｉｎ Ｃｏｌｕｍｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐｓを行い、そして引き続いてそのＤＮＡを、ＥｃｏＲ１制限酵素およびアガロースゲル電気泳動の評価を使用して、挿入物について分析した。２３個のクローンを挿入物の配列の存在について評価した。３つのクローンは、表１に示されるヌクレオチド配列を有する挿入物を含んだ。

【００３９】

表２に示されるポリペプチドは、膜貫通ドメインを含まないＣＲＦ２ファミリーの第１のメンバーである。従って、このポリペプチドは、細胞から分泌される可能性がある。コードされるＯＲＦは、ＺｃｙｔｏＲ７、ＺｃｙｔｏＲ１１および組織因子と最も高い相同性を有する。表２で示されるポリペプチドもまた、先に記載したクラスＩＩサイトカインレセプターと高い類似性を示す。先に記載したサイトカインレセプター因子との関連性を、以下に示す。

【００４０】

【表７】

(SwissProt+ SpTrEMBL における) エントリーの一致	開始－終結	説明	スコア	E 値
Q9YGC8	[30-227]	インターロイキン -10 レセプター 2.	73.4	1e-12
I10R_マウス	[31-149]	インターロイキン-10 レセプター前駆体 (IL-10R).	63.6	1e-09
I10S_マウス	[6-227]	インターロイキン-10 レセプター β鎖 前駆体(IL-10R-B) (IL-10R2)(サイトカインレセプター クラス -II CRF2-4).	62.8	2e-09

I10S_マウス	[6-227]	インターロイキン-10 レセプター β鎖 前駆体(IL-10R-B) (IL-10R2)(サイトカインレセプター クラス-II CRF2-4).	62.8	2e-09
INR1_ウシ	[22-209] [24-207]	インターフェロン－α/β レセプター α鎖 前駆体(IFN-α-REC).	62.5	2e-09
TF_ヒト	[11-228]	組織因子 前駆体(TF) (血液凝固 因子 III)(トロンボプラスチン) (CD142 抗原).	61.7	4e-09
CRF4_ヒト	[31-227]	サイトカインレセプター クラス-II CRF2-4 前駆体.	61.7	4e-09
Q9YHW0	[31-229] [22-228]	インターフェロン－α/β レセプター1.	59.3	2e-08
INR1_MOUSE マウス	[27-228]	インターフェロン－α/β レセプター α鎖 前駆体 (IFN-α-REC).	58.9	3e-08
I10R_HUMAN ヒト	[1-230]	インターロイキン-10 レセプター前駆体(IL-10R).	57.0	1e-07
TF_BOVIN ウシ	[11-167]	組織因子 前駆体(TF) (血液凝固 因子 III).	55.0	4e-07
INR1_SHEEP ヒツジ	[24-207] [22-209]	インターフェロン－α/β レセプター α鎖 前駆体(IFN-α-REC)(インターフェロン α/β レセプター -1).	54.3	7e-07
INR1_HUMAN ヒト	[31-207] [36-227]	インターフェロン－α/β レセプター α鎖 前駆体(IFN-α-REC).	54.3	7e-07
INGR_HUMAN ヒト	[10-230]	インターフェロン－γ レセプター α鎖 前駆体(CDW119).	51.2	6e-06
Q9YHV9	[31-228]	インターフェロン－α/β レセプター2.	49.2	2e-05

TF_ウサギ（RABIT）	[11-144]	組織因子前駆体（TF）（血液凝固因子 III）.	48.4	4e-05
TF_ラット	[7-145]	組織因子前駆体（TF）（血液凝固因子 III）.	47.6	6e-05

表２に示されるポリペプチドと、先に記載した２型サイトカインレセプターポリペプチドとの間の関連性の程度は、２１％～３４％の同一性の範囲である。４０～４７％のアミノ酸が、ポジティブなアミノ酸として関連する。

【００４１】

Ｑ９ＹＧＣ８　ｇａｌｌｕｓ　ｇａｌｌｕｓ（ニワトリ）インターロイキン－１０レセプター２（５／１９９９）と、表２に示されるアミノ酸配列のアミノ酸３０位～２２７位との間のアラインメントを以下に提供する。示されるアラインメントについては、長さ＝３４１、スコア＝７３．４、ビット（１７７．０）、期待値＝$1e^{-12}$、同一性＝５６／２００（２８％）、およびポジティブ＝９２／２００（４６％）である。

【００４２】

【表８】

```
Query: 30 KPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQWKNKEDCWGTQELSCDL 88

          KP+  +  S NF ++L W P     GN S Y VQ K I+ ++ + N        E CD+

Sbjct: 23 KPRNARISSVNFRSVLLWDPPGVRKGNLS-YTVQAKSIFPKQNFNNVTTNLNVTE--CDV
79


Query: 89 TSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLVILHA
148

          +S    +   Y  RVR      +S+W++  RF P  +T I  PP +N+    +G+L V

Sbjct: 80  SS--LSVYGAYVLRVRTEWEDEHSDWAVV-RFKPMADTVIGPPSVNVKSESGTLHVDFTG
136


Query: 149 PNLPYRYQKEKNVSIEDYY-ELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCV
207

           P     + K    S++ YY   +YR+         K+    +  H +  +  L P + YC+

Sbjct: 137 PAADREHDK---WSLKQYYGSWIYRILYWKKGSNKKVIHIDTKHNSEILSQLEPWTIYCI
193


Query: 208 VAEIYQPMLDRRSQRSEERC 227

              +   P  ++  +RS+E C

Sbjct: 194 QVQGVIPEWNKTGERSQELC 213
```

【００４３】

プライマーＡＴＧＡＴＧＣＣＴＡＡＡＣＡＴＴＧＣＴＴＴＣＴＡＧＧ（配列番号９）およびプライマーＴＣＡＴＧＧＡＡＴＴＴＣＣＡＣＡＣＡＴＣＴＣＴＴＣＡＣ（配列番号１０）を使用するＰＣＲ増幅アッセイにおいて、さらなるＣＲＦ２－１３のコード配列を同定した。種々のヒト組織由来のプールされたｃＤＮＡにおいて、表３に提供される配列

を含むｃＤＮＡを同定した。表５に示される配列を含むｃＤＮＡを、胃組織由来のｃＤＮＡライブラリーにおいて同定した。表１に示されるＤＮＡのクローニングについて使用された、同様のライゲーション方法、形質転換方法、スクリーニング方法および配列決定方法を使用して、表３および表５に示される配列を含むｃＤＮＡを作製した。

【００４４】

本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドをコードするマウスヌクレオチド配列を、表７に示す。

【００４５】

【表９】

表　7

GGAACTCTGGTTGCCAGACAAGCACACTTGCAACCATGATGCCTAAGCATTGCCTTCTAGGTCTCCTCATCA
TACTCTTGAGCAGTGCAACAGAAATACAACCAGCTCGTGTATCTCTGACGCCCCAGAAGGTCCGATTTCAGT
CCAGAAATTTCCACAATATTTTGCACTGGCAAGCAGGGAGCTCTCTCCCCAGCAACAACAGCATCTACTTTG
TGCAGTACAAGATGTATGGACAGAGCCAATGGGAAGATAAAGTTGACTGCTGGGGGACCACGGCGCTCTTCT
GTGACCTGACCAATGAAACCTTAGACCCATACGAGCTGTATTACGGGAGGGTGATGACGGCCTGTGCTGGAC
GCCACTCTGCCTGGACCAGGACACCCCGCTTCACTCCATGGTGGGAAACAAAACTAGATCCTCCGGTCGTGA
CTATAACCCGAGTTAACGCATCTTTGCGGGTGCTTCTCCGTCCTCCAGAGTTGCCAAATAGAAACCAAAGTG
GAAAAAATGCATCCATGGAAACTTACTACGGCTTAGTATACAGAGTTTTCACAATCAACAATTCACTAGAGA
AGGAGCAAAAAGCCTATGAAGGGACTCAGAGAGCTGTTGAAATTGAAGGTCTGATACCTCATTCCAGCTACT
GCGTAGTGGCTGAAATGTACCAGCCCATGTTTGACAGAAGAAGCCCAAGAAGCAAGGAGAGATGTGTGCAGA
TTCCATGA （配列番号 11）

【００４６】

表７に示されるヌクレオチド配列は、表８に示されるアミノ酸配列を有する２３０アミノ酸のポリペプチドをコードする。

【００４７】

【表１０】

表　8

MMPKHCLLGLLIILLSSATEIQPARVSLTPQKVRFQSRNFHNILHWQAGSSLPSNNSIYFVQYKMYGQSQWE
DKVDCWGTTALFCDLTNETLDPYELYYGRVMTACAGRHSAWTRTPRFTPWWETKLDPPVVTITRVNASLRVL
LRPPELPNRNQSGKNASMETYYGLVYRVFTINNSLEKEQKAYEGTQRAVEIEGLIPHSSYCVVAEMYQPMFD
RRSPRSKERCVQIP （配列番号 12）

【００４８】

ヒトＣＲＦ２－１３配列に基づくプローブを使用して、マウスの配列を同定した。マウスＣＲＦ２－１３配列の単離および性質決定を、以下の実施例において詳細に開示する。

【００４９】

ＣＲＦ２－１２核酸およびコードされるペプチドは、本発明に従い、種々の適用および状況において有用である。例えば、配列比較は、開示のＣＲＦ２－１２核酸（表１、表３、表５および表７）がＣＲＦ２－１２ファミリーのレセプターの分泌されるメンバーをコードすることを明らかにする。１つ以上の分泌されるレセプターの鎖は、ＣＲＦ２の別の膜結合性メンバーまたは別のファミリーの膜結合性レセプターと会合し得、および／またはそれらの活性を調節し得る。あるいは、またはさらに、本明細書中で開示されるレセプター鎖は、単特で作用し得るか、または別の可溶性レセプターと組み合わせて作用し得る。その効果において、そのレセプターはリガンドでもあり得る。

【００５０】

表２、表４および表６に示されるポリペプチド配列に基づいたポリペプチドの代替形態が、異なる組織および／または異なる条件において発現され得、そしてそれによって組織特異的な影響を実行し得る。

【００５１】

本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドはさらに、可溶性のレセプターアンタゴニストとして使用され得る。特定のサイトカイン（例えば、ＴＮＦ）の活性をブロックする可溶性レセプターアンタゴニストは、当該分野で公知である。本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、同様に、ＣＲＦ２メンバーを介して作用するサイトカインの活性をブロックし得る。このようなポリペプチドの例としては、ＩＬ－１０、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０、ＩＬ－２２、ＡＫ１５５、ｍｄａ－７またはインターフェロン（例えば、インターフェロンα、インターフェロンβまたはインターフェロンγ）が挙げられる。

【００５２】

１つの実施形態において、本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドを使用して、ＩＬ－２２の機能を拮抗する。ＩＬ－２２はＩＬ－１０と配列において遠い関係にあり、そして活性化されたＴ細胞によって産生される。ＩＬ－２２の細胞内へのシグナル伝達は、そのレセプター鎖ＩＬ－２２ＲおよびＣＲＦ２－４（両者ともＣＲＦ２ファミリーのメンバー）によって媒介される。このＣＲＦ２－４レセプターは、元々、ＩＬ－１０シグナル伝達における第２成分として役立つことが報告された。ＩＬ－２２は、ヒトＴｈ２　Ｔ細胞からのＩＬ－４産生を阻害すること、およびマウスの肝臓において急性期タンパク質を誘導することが報告された。

【００５３】

本発明に従い、ＣＲＦ２－１２核酸およびＣＲＦ２－１２ポリペプチドをさらに使用して、細胞集団において、本発明を作製する細胞型または本発明と結合する細胞型を同定し得る。このＣＲＦ２－１２核酸およびＣＲＦ２－１２ポリペプチドはまた、単独でかまたは別のレセプターと併用して、この可溶性レセプターと会合するリガンド、ならびにこのリガンドが上記の作用機構および／または病因に対して有する影響に基づいて、免疫調節、炎症、免疫抑制、アレルギー、喘息、自己免疫疾患（慢性関節リウマチおよび多発性硬化症を含む）、血管の損傷または疾患の後の血管平滑筋細胞の修復、移植、および癌のために使用され得る。

【００５４】

例えば、本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、以下の活性のうちの１つ以上を示し得る：（１）調節（例えば、サイトカイン（例えばＩＬ－１０またはＩＬ－２２）により媒介されるシグナル伝達経路を拮抗し得る）；（２）サイトカインの産生および／または分泌の調節（例えば、炎症誘発性サイトカインの産生および／または分泌）；（３）リンホカインの産生および／または分泌の調節；（４）核内転写因子の発現または活性の調節；（５）サイトカインリガンドのサイトカインレセプターとの競合；（６）細胞の増殖、成長または分化（例えば、サイトカイン（例えば、ＩＬ－１０またはＩＬ－２２）に刺激される産生、成長および分化）の調節；（７）細胞免疫応答の調節；サイトカイン媒介性の炎症誘導作用の調節；ならびに／または免疫反応の促進および／もしくは潜在力。

【００５５】

本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、膜結合レセプターと会合して直接的にか、または可溶性リガンドとのそれの会合により間接的に、以下の細胞型の１つ以上に影響し得るか、またはそれら細胞型に効力をもたらし得る：循環する細胞または組織と会合した細胞：Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫ　Ｔ細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球、ニュートロフィル、肥満細胞、好塩基球、好酸球、ならびに気道、膵臓、腎臓、肝臓、小腸および大腸における細胞。本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、さらに、ホルモン性免疫応答および細胞媒介性免疫反応の上方制御を調節し得；炎症誘導性のサイトカインおよびケモカインの合成を調節し得；そして、創傷、敗血症、胃腸疾患および心血管疾患、または外科手術後の炎症に関連した炎症応答を、調節し得る。

【００５６】

タンパク質の効果的な産生のために、ＣＲＦ２－１２配列を、所望される宿主における発現が最適化された発現制御配列の制御下に置くことが好ましい。例えば、その配列は、最適化された転写制御配列および／または翻訳制御配列（例えば変更されたＫｏｚａｋ配列）を含み得る。さらに、ＣＲＦ２－１２タンパク質の成熟アミノ末端は、タンパク質の成

熟アミノ末端の予測的決定または経験的決定に基づいて、ＣＲＦ２－１２のものでないシグナル配列と、作動可能に連結され得る。

【００５７】

ＣＲＦ２－１２融合タンパク質を使用して、当該分野で公知のアッセイを使用して、結合パートナーを同定および決定し得る。これらのアッセイとしては、例えば、組織学的免疫化学的ＢＩＡＣＯＲＥまたは細胞生物学ベースのアッセイが挙げられる。

【００５８】

アッセイはまた、本発明のＣＲＦ２－１２タンパク質が、ＣＲＦ２ファミリーの他のメンバーをすでに発現する細胞型と結合するか否かを決定するために、実施され得る。本発明のＣＲＦ２－１２はまた、公知のサイトカインまたは新規のサイトカインの活性を（例えば、サイトカインの機能を阻害することにより、またはさもなければ、この機能を拮抗することにより）調節するその能力について、試験され得る。

【００５９】

例えば、いくつかの新規のＩＬ－１０様分子がクローニングされた。ＩＬ－２２はこれらの分子うちの１つである。この分子がＴｈ２細胞（ヒト）によるＩＬ－４の産生をブロックして、そして急性期応答（マウス）を開始することが報告された。ＣＲＦ２－１２がＩＬ－２２（またはＩＬ－１０様の分子）と結合してそしてＩＬ－２２を阻害するという知見は、本発明のＣＲＦ２－１２を使用して高レベルのＩＬ－２２ポリペプチドと関連した疾患の処置し得るかまたは予防し得ることを、示す。

【００６０】

本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドが、他のレセプターおよび／またはＣＲＦ２ファミリー内の関連サイトカインと結合することもまた予測される。例えば、本発明のＣＲＦ２－１２は、ＩＬ－２２Ｒのいずれかの鎖と会合し得、そしてそのレセプターまたはＩＬ－２２リガンドの機能に影響し得る。

【００６１】

（ＣＲＦ２－１核酸）

本発明の核酸は、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドまたはＣＲＦ２－１２タンパク質をコードする核酸を含む。本明細書中で使用される場合、用語ポリペプチドおよびタンパク質は、相互交換可能である。

【００６２】

いくつかの実施形態において、ＣＲＦ２－１２核酸は、成熟のＣＲＦ２－１２ポリペプチドをコードする。本明細書中で使用される場合、明細書中で記載される「成熟の」形態のポリペプチドまたはタンパク質は、天然に存在するポリペプチドまたは前駆体形態またはプロタンパク質の産物に関する。天然に存在するポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質としては、非限定的な例として、対応する遺伝子によりコードされる、全長の遺伝子産物が挙げられる。あるいは、本明細書中に記載されるオープンリーディングフレームによりコードされる、ポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質として規定され得る。産物の「成熟の」形態は、再び非限定的な例として、その遺伝子産物が生じる細胞内で起こり得る、１つ以上の天然に存在するプロセシング工程の結果として生じる。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟の」形態を導くこのようなプロセシング工程の例としては、オープンリーディングフレームの開始コドンによりコードされるＮ末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチド配列もしくはリーダー配列のタンパク質分解性の切断が、挙げられる。従って、残基１～Ｎを有する、前駆体のポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟の形態（ここで、残基１はＮ末端のメチオニンである）は、Ｎ末端メチオニンの除去後、残存する残基２～Ｎを有する。あるいは、残基１～Ｎを有する、前駆体のポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟の形態は、残基１～残基ＭのＮ末端シグナルペプチドが切断される場合、残存する残基Ｍ＋１～残基Ｎを有する。さらに本明細書中で使用される場合、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟の」形態は、タンパク質分解性の切断現象以外の翻訳後修飾の工程から生じ得る。このような追加の過程としては、非限定的な例として、グリコシル化、ミリストイル化またはリン酸化が挙げられる。一般的に、成

熟のポリペプチドまたはタンパク質は、これらの過程のうちのただ１つの操作から生じ得るか、またはこれらの過程の任意の組み合わせから生じ得る。

【００６３】

配列が、配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号１１において提供される核酸またはそれらのフラグメントは、ＣＲＦ２－１２核酸の中のうちである。さらに、本発明は、配列番号１、配列番号３、配列番号５もしくは配列番号１１の変異体核酸もしくは改変体核酸、またはそれらのフラグメントを含み、これらのうちの任意の塩基は対応する塩基から変更され得るが、そのＣＲＦ２－１２様活性および生理学的機能（例えば、サイトカインに結合すること）のうちの少なくとも１つを維持するタンパク質を依然としてコードする。本発明はさらに、開示されたＣＲＦ２－１２核酸の核酸配列（そのフラグメント、誘導体、アナログおよびホモログを含む）の相補体を含む。本発明はさらに、核酸もしくは核酸フラグメント、またはその相補体を含み、それらの構造体は化学修飾を含む。

【００６４】

本発明はまた、ポリペプチド配列ＭＭＰＫＨＣＬ／ＦＬＧＬ／ＦＬＩ（配列番号１３）、ＦＱＳＲＮＦＨＮＩＬＨ／ＱＷＱ　Ａ／ＰＧ（配列番号１４）、ＳＩ／ＶＹＦＶＱＹＫＭ／ＩＹＧＱＳ／ＲＱＷ（配列番号１５）、ＴＰＲＦＴＰＷＷＥＴＫＬ／ＩＤＰＰＶ（配列番号１６）、ＬＶ／ＬＹＲＶＦＴ／ＩＩＮＮＳＬＥＫＥＱＫＡ／ＶＹＥＧ（配列番号１７）、ＲＡＶＥＩＥＧ／ＡＬＩ／ＴＰＨＳＳＹＣＶＶＡＥＭ／ＩＹＱＰＭ（配列番号１８）およびＤＲＲＳＰ／ＱＲＳＫ／ＥＥＲＣＶＱ／ＥＩＰ（配列番号１９）のうちの１つ以上を有する、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドをコードする核酸を含む。

【００６５】

本発明の１つの局面は、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子に関する。また、ＣＲＦ２－１２をコードする核酸（例えば、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡ）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての用途にとって十分なフラグメント、およびＣＲＦ２－１２核酸分子の増幅または変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）プライマーとしての用途のためのフラグメントも包含される。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、ヌクレオチドアナログを使用して作製されるＤＮＡまたはＲＮＡのアナログ、ならびにそれらの誘導体、フラグメント、およびホモログを含むことが企図される。核酸分子は、１本鎖または２本鎖であり得るが、好ましくは、２本鎖ＤＮＡである。

【００６６】

「プローブ」は、可変長の核酸配列であって、その長さは、好ましくは、その用途に依存して、約１０ヌクレオチド（ｎｔ）、約１００ｎｔ、または約６０００ｎｔもの大きさであり得る。プローブは、同一、類似、または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長いプローブが、通常、天然の供給源または組換え供給源から得られ、非常に特異的であり、かつオリゴマーよりも遅くハイブリダイズする。プローブは、１本鎖または２本鎖であり得、そして、ＰＣＲ技術、メンブレン（膜）依存型ハイブリダイゼーション技術、またはＥＬＩＳＡに類似の技術において特異性を有するように設計され得る。

【００６７】

「単離（単離された）」核酸分子は、この核酸の天然供給源において存在する他の核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子の例としては、ベクターに含まれる組換えＤＮＡ分子、異種宿主細胞において維持される組換えＤＮＡ分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成ＤＮＡ分子または合成ＲＮＡ分子が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、「単離」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムＤＮＡ中で、この核酸に天然において隣接する配列（すなわち、この核酸の５’末端および３’末端に位置する配列）を有さない。例えば、種々の実施形態において、この単離ＣＲＦ２－１２核酸分子は、この核酸が由来する細胞のゲノムＤＮＡ中の核酸分子に天然で隣接するヌクレオチド配列の、５０ｋｂ、２５ｋｂ、５ｋｂ、４ｋｂ、３ｋｂ、２ｋｂ、１ｋｂ、０．５ｋｂ、または０．１ｋｂ未満を含み得る。さらに、「単離」核酸分子

（例えば、ｃＤＮＡ分子）は、組換え技術によって作製された場合に他の細胞性物質または培養培地を実質的に含み得ず、また化学合成された場合には、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含み得ない。

【００６８】

本発明の核酸分子（例えば、配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号５、配列番号１１のヌクレオチド配列、またはそれらの相補体を有する核酸分子）は、標準的な分子生物学的技術および本明細書中において提供された配列情報を使用して単離され得る。配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１の核酸配列の全てまたは一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、ＣＲＦ２－１２核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーション技術および標準的なクローニング技術（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら編、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ 第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ、１９８９およびＡｕｓｕｂｅｌら編、ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ、１９９３に記載されるようなそれらの技術）を使用して、単離され得る。

【００６９】

本発明の核酸分子は、ｃＤＮＡ，ｍＲＮＡ、また、あるいは、ゲノムＤＮＡを、標準的なＰＣＲ増幅技術に従ったテンプレートおよび適切なオリゴヌクレオチドプライマーとして使用して、増幅され得る。そのように増幅された核酸は、適切なベクターにクローニングされ、そして、ＤＮＡ配列分析によって特徴付けられ得る。さらに、ＣＲＦ２－１２ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術（例えば、自動ＤＮＡ合成機の使用）によって、調製され得る。

【００７０】

本明細書中において使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲ反応において使用されるのに十分な数のヌクレオチド塩基を有している。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列またはｃＤＮＡ配列に基づき得るか、またはそれらにから設計され得、そして、この短いオリゴヌクレオチドは、特定の細胞または組織中の同一、類似、または相補的なＤＮＡまたはＲＮＡを、増幅し、それらの存在を確認し、またはそれらの存在を明らかにするために使用される。オリゴヌクレオチドは、約１０ｎｔ長、約５０ｎｔ長、または約１００ｎｔ長、好ましくは、約１５ｎｔ～約３０ｎｔ長を有する核酸配列の部分を含む。１つの実施形態において、１００ｎｔ長未満の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドはさらに、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１あるいはそれらの相補体の少なくとも６連続したヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、化学合成され得、そしてプローブとして使用され得る。

【００７１】

別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１あるいはそのヌクレオチド配列の部分に示されたヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含み得る。配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１あるいはそのヌクレオチド配列の部分に示されたヌクレオチド配列の相補体である核酸分子は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１に示されたヌクレオチド配列とミスマッチをほとんど有することなく、またはミスマッチを有さないで水素結合し得、それによって、安定な二重鎖を形成し得る、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１に示されたヌクレオチド配列に十分に相補的な核酸分子である。

【００７２】

本明細書中において使用される場合、用語「相補的（相補的である）」とは、核酸分子のヌクレオチド単位間のＷａｔｓｏｎ－Ｃｒｉｃｋ塩基対形成またはＨｏｏｇｓｔｅｅｎ塩基対形成をいい、そして、用語「結合（結合する）」とは、２つのポリペプチドもしくは

化合物または会合したポリペプチドもしくは化合物あるいはそれらの組み合わせの間の物理学的相互作用また化学的相互作用を意味する。結合としては、イオン相互作用、非イオン相互作用、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用などが挙げられる。物理学的相互作用は、直接的または間接的のいずれかであり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物の効果を介し得るか、またはそれらに起因し得る。直接結合とは、別のポリペプチドまたは化合物の効果を介して、または、それらに起因して生じず、その代わり、他の実質的な化学中間体を有さない相互作用をいう。

【００７３】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号１１または配列番号１１の核酸配列の一部分（例えば、プローブまたはプライマーとして使用され得るフラグメント、あるいはＣＲＦ２－１２の生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）のみを含み得る。本明細書中で提供されるフラグメントは、少なくとも６の（連続した）核酸または少なくとも４の（連続した）アミノ酸の配列、つまり、核酸の場合においては、特定のハイブリダイゼーション、または、アミノ酸の場合においては、エピトープの特定の認識を可能にするのに十分な長さとして、それぞれ定義され、フラグメントは、高々、全長配列未満のいくつかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続した部分に由来し得る。誘導体は、直接的に、あるいは改変または部分的置換のいずれかによって、天然化合物から形成され得る、核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、天然の化合物に類似の構造をしているが、それに対して同一ではなく、特定の構成性分または側鎖に関して異なっている核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成性であり得るか、または、異なる進化的な起源に由来し、かつ、野生型と比較して類似または反対の代謝活性を有し得る。

【００７４】

誘導体およびアナログは、上述のように、これらの誘導体またはアナログが修飾された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長であり得るか、または全長ではない。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログとしては、種々の実施形態において、同一サイズの核酸またはアミノ酸のとき、または、アライメントされた配列（ここで、このアライメントは、当該分野で公知の相同性プログラムによって行われる）と比較したときに、少なくとも約７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、または９９％もの同一性（結果として、好ましくは８０～９９％である）によって、本発明の核酸またはタンパク質に実質的に相同な領域を含む分子、またはそれをコードする核酸が、ストリンジェントな条件、中程度にストリンジェントな条件、または低度にストリンジェントな条件下で、上述のタンパク質をコードする配列にハイブリダイズし得る分子が挙げられるが、これらに限定されない。Ａｕｓｕｂｅｌら、ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ １９９３および以下を参照のこと。例示的なプログラムは、Ｇｐａプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ、ＵＮＩＸ（登録商標）版バージョン８、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）であり、これは、Ｓｉｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムを用いるデフォルトの設定を使用する（Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．、１９８１，２：４８２－４８９（これらは全体が参考として援用される））。

【００７５】

「相同（相同性）核酸配列」または「相同（相同性）アミノ酸配列」あるいはその改変体は、上で議論したヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同性ヌクレオチド配列は。ＣＲＦ２－１２ポリペプチドのアイソフォームをコードするこれらの配列をコードする。アイソフォームは、例えば、ＲＮＡの選択的スプライシングの結果として、同じ生物種の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、ヒト以外の種のＣＲＦ２－１２ポリペプチドをコードするヌクレ

オチド配列を含み、この種としては、哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されず、従って、このアイソフォームは、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物体を含み得る。相同なヌクレオチド配列としては、本明細書中に示されるヌクレオチド配列の、天然に存在する対立遺伝子のバリエーションおよび変異体を含み得るが、これららに限定されない。しかし、相同性ヌクレオチド配列は、ヒトＣＲＦ２－１２タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。相同な核酸配列は、配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２ならびにＣＲＦ２－１２活性を有するポリペプチドにおける保存的アミノ酸置換体（以下を参照のこと）をコードする核酸配列を含む。例えば、本発明のＣＲＦ２－１２ヌクレオチドは、配列番号２の２１～６２のアミノ酸と比較して、そのアミノ酸配列において、１以上、例えば、２、３、５、１０、１５、２０、または２５あるいはそれ以上の置換を有するポリペプチドをコードする核酸を含む。

【００７６】

ＣＲＦ２－１２タンパク質の生物学的活性は、以下に記載される。相同性はアミノ酸配列は、ヒトＣＲＦ２－１２ポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

【００７７】

ヒトＣＲＦ２－１２遺伝子のクローニングから決定されるヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来の細胞型）ならびに他の哺乳動物由来のＣＲＦ２－１２ホモログを同定および／またはクローニングにおける用途にために設計されたプローブおよびプライマーの作製を可能にする。これらのプローブ／プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１の、少なくとも約１２、２５、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、または４００あるいはそれ以上の保存的なセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいはこれらの配列の一方のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいはこれらのうちの一方の天然に存在する変異体にストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【００７８】

ヒトＣＲＦ２－１２ヌクレオチド配列に基づくプローブは、同一または相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。種々の実施形態において、このプローブは、さらに結合した標識基、をさらに含み、例えば、この標識基は、放射性同位体、蛍光発光性化合物、酵素、酵素補因子であり得る。このようなプローブは、被験体由来の細胞のサンプル中のＣＲＦ２－１２コード核酸のレベルを測定することによって（例えば、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡを検出することによって、またはゲノムＣＲＦ２－１２遺伝子が変異または欠失されたか否かを決定することによって）、ＣＲＦ２－１２タンパク質を誤って発現（ｍｉｓｅｘｐｒｅｓｓ）する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として使用され得る。

【００７９】

「ＣＲＦ２－１２の生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、用量依存的であっても、用量依存的でなくとも、特定の生物学的アッセイにおいて、測定されるように、本発明のポリペプチドの活性に類似の活性であって、それに必ずしも同一ではない活性を提示する（成熟形態を含む）ポリペプチドをいう。「ＣＲＦ２－１２の生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、ＣＲＦ２－１２生物学的活性（ＣＲＦ２－１２タンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１の一部分を単離し、ＣＲＦ２－１２タンパク質のうちのコードされた部分を（例えば、インビトロでの組換え発現によって）発現し、そして、ＣＲＦ２－１２のコード部分の活性を評価することによって、調製され得る。例えば、ＣＲＦ２－１２の生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、必要に応じてＡＴＰ結合ドメインを含み得る。別の実施形態において、ＣＲＦ２－１２の生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、１以上の領域を含む。

【００８０】

（ＣＲＦ２－１２改変体）

本発明は、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１に示されるヌクレオチド配列と異なる核酸分子をさらに含む。従って、これらの核酸は、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１に示されているヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質（例えば、それぞれ、配列番号２、配列番号４、配列番号６、または配列番号１２のポリペプチド）と同じＣＲＦ２－１２タンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、それぞれ。配列番号２、配列番号４、配列番号６、または配列番号１２に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【００８１】

配列番号１、配列番号３、配列番号５、配列番号７または配列番号１１に示されるヒトＣＲＦ２－１２ヌクレオチド配列に加えて、ＣＲＦ２－１２のアミノ酸配列における変化を生じるＤＮＡ配列多型が、集団（例えば、ヒト集団）において存在し得る。ＣＲＦ２－１２遺伝子におけるこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体中に存在し得る。本明細書中で使用される場合、「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、ＣＲＦ２－１２タンパク質、好ましくは、哺乳動物ＣＲＦ２－１２タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子バリエーションは、代表的には、ＣＲＦ２－１２遺伝子のヌクレオチド配列において１～５％の分散を生じ得る。任意および全てのこのようなヌクレオチドバリエーション、および天然対立遺伝子バリエーションの結果であり、かつＣＲＦ２－１２の機能活性を変更しない、ＣＲＦ２－１２における得られたアミノ酸多型は、本発明の範囲に包含されることが企図される。

【００８２】

さらに、他の種由来のＣＲＦ２－１２タンパク質をコードしており、かつ配列番号１、配列番号３もしくは配列番号５のヒトの配列、または配列番号１１のマウス配列とは異なるヌクレオチド配列を有する、核酸分子は、本発明の範囲に包含されることが企図される。本発明のＣＲＦ２－１２　ｃＤＮＡの天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、ストリンジェントな条件下でヒトｃＤＮＡまたはその一部分を標準ハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとして使用し、本明細書中において開示されるヒトＣＲＦ２－１２核酸に対するそれらの相同性に基づいて単離され得る。例えば、可溶性型のヒトまたはマウスＣＲＦ２－１２　ｃＤＮＡは、ヒト膜結合型ＣＲＦ２－１２にたいする相同性に基づいて単離され得る。同様にして、膜結合型のヒトまたはマウスのＣＲＦ２－１２　ｃＤＮＡは、可溶型ヒトＣＲＦ２－１２に対する相同性に基づいて、単離され得る。

【００８３】

従って、別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも６ヌクレオチド長であり、かつ、配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１のヌクレオチド配列を含む核酸分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする。別の実施形態において、この核酸は、少なくとも、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、または７５０ヌクレオチド長である。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、そのコード領域にハイブリダイズする。本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェント条件下でのハイブリダイズ（ストリンジェント条件下でハイブリダイズする）」は、互いに対して少なくとも６０％相同性であるヌクレオチド配列が、代表的には、互いにハイブリダイズすることが保持される、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を記述することを企図される。

【００８４】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来であるＣＲＦ２－１２タンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ）は、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングのための当該分野で周知の方法を使用する、プローブとして全部または一部分の特定ヒト配列との低度、中程度、または高度にストリンジェントなハイブリダイゼーションによって、取得され得る。

【００８５】
本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドが、それらの標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェント条件は、配列依存的であり、異なる環境においてストリンジェント条件は異なる。より長い配列は、より高温において、短い配列よりも特異的にハイブリダイズする。一般的に、ストリンジェント条件は、規定されたイオン強度およびｐＨで特定の配列についての熱融解温度（T_m）よりもおおよそ５℃低いように選択される。このT_mは、標的配列に対して相補的なプローブの５０％が、平衡状態での標的配列に対してハイブリダイズする（規定されたイオン強度、ｐＨ、および核酸濃度のもとでの）温度である。標的配列は、一般に過剰に存在するので、T_mにおいて、このプローブの５０％は、平衡状態で占められている。代表的には、ストリンジェント条件は、塩濃度が約１．０Ｍ未満のナトリウムイオンであり、代表的には、ｐＨ７．０～８．３で約０．０１～１．０Ｍナトリウムイオン（または他の塩）であり、かつこの温度は、短い（例えば、１０～５０ｎｔの）プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドについて少なくとも約３０℃であり、そしてより長いプローブ、プライマー、およびオリゴヌクレオチドについては少なくとも６０℃である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような不安定化剤の添加によっても達成される。

【００８６】
ストリンジェントな条件は、当業者にとって公知であり、そしてＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｅｌｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎ．Ｙ．（１９８９）、６．３．１～６．３．６において見出される。好ましくは、この条件は、互いに対して少なくとも６５％、７０％、７５％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％相同性であるヌクレオチド配列が、代表的には、互いにハイブリダイズすることが保持される条件である条件である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、６×ＳＳＣ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．０２％　ＰＶＰ、０．０２％　Ｆｉｃｏｌｌ、０．０２％　ＢＳＡ、および５００ｍｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡを６５℃で含む高塩緩衝液でのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーションの後に、５０℃で、０．２×ＳＳＣ、０．０１％　ＢＳＡで１回以上の洗浄する。配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１の配列に対してストリンジェント条件でハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然において存在する（例えば、天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有する、ＲＮＡ分子またはＤＮＡ分子をいう。

【００８７】
第２の実施形態において、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１、あるいはそれらのフラグメント、アナログ、または誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズ可能な、核酸配列は、中程度のストリンジェンシーの条件下で、提供される。中程度のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、５５℃での、６×ＳＳＣ、５×デンハルト溶液、０．５％ＳＤＳおよび１００ｍｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ中のハイブリダイゼーション、その後の、３７℃での、１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳでの１回以上の洗浄である。使用され得る中程度のストリンジェントの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、１９９３、ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｅｌｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹおよびＫｒｉｅｇｌｅｒ、１９９０、ＧＥＮＥ　ＴＲＡＮＳＦＥＲ　ＡＮＤ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ、Ａ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ　ＭＡＮＵＡＬ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹを参照のこと。

【００８８】
第３の実施形態において、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１の

ヌクレオチド配列を含む核酸分子、あるいはそれらのフラグメント、アナログ、または誘導体は、低度のストリンジェントな条件で、提供される。低度のストリンジェントなハイブリダイゼーションの非限定的例は、４０℃での、３５％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５ｍＭ　ＥＤＴＡ，０．０２％　ＰＶＰ、０．０２％フィコール、０．２％ＢＳＡ、１００ｍｇ／ｍｌ変性サケ精子ＤＮＡ、１０％（ｗｔ／ｖｏｌ）硫酸デキストラン、その後の、５０℃における、２×ＳＳＣ、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、および０．１％ＳＤＳ中での１回以上の洗浄である。使用され得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である（例えば、交差種ハイブリダイゼーションについて使用される）。例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）、１９９３、ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬ　ＩＮ　ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｅｌｙ＆Ｓｏｎｓ、ＮＹおよびＫｒｉｅｇｌｅｒ、１９９０、ＧＥＮＥ　ＴＲＡＮＳＦＥＲ　ＡＮＤ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ、Ａ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ　ＭＡＮＵＡＬ、Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ；ＳｈｉｌｏおよびＷｅｉｎｂｅｒｇ、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８」６７８９－６７９２を参照のこと。

【００８９】

（保存的変異）

集団中に存在し得るＣＲＦ－１２配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１のヌクレオチド配列に、変化が変異によって導入され得、これによって、ＣＲＦ２－１２タンパク質の機能的能力を変化することなしにコード化ＣＲＦ－１２タンパク質のアミノ酸配列に変化を導入し得るということをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導入するヌクレオチド置換は、配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１の配列中でなされ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変化させることなく、ＣＲＦ２－１２の野生型配列から変化され得る残基である一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のＣＲＦ２－１２タンパク質間で保存されるアミノ酸残基は、特に改変の影響を受けにくいと予想される。

【００９０】

本発明の別の局面は、活性に必須でないアミノ酸残基における変化を含むＣＲＦ２－１２タンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなＣＲＦ２－１２タンパク質は、配列番号２、配列番号４、または配列番号１２のアミノ酸配列とは異なり、なお生物学的活性を維持する。１つの実施形態において、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む一方、タンパク質は、これらのアミノ酸配列の１つに対して少なくとも約７５％の相同性のアミノ酸配列を含む。好ましくは、核酸によってコードされるタンパク質は、これらのアミノ酸配列の１つに対して少なくとも約８０％相同性であって、より好ましくは、これらのアミノ酸配列の１つに対して少なくとも約９０％、約９５％、約９８％、そして最も好ましくは少なくとも約９９％相同性である。

【００９１】

配列番号２、配列番号４、配列番６または配列番号１２のタンパク質に対して相同なＣＲＦ２－１２タンパク質をコードする単離された核酸分子は、１つ以上のヌクレオチドの置換、付加、または欠失を、配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１のヌクレオチド配列に導入することによって作製され得、その結果、１つ以上のアミノ酸の置換、付加、または欠失が、コード化タンパク質に導入される。

【００９２】

変異は、標準的技術（例えば、部位特異的変異、およびＰＣＲ媒介変異）によってＣＲＦ２－１２ヌクレチド配列（例えば、配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１）に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、１つ以上の推定非必須アミノ酸残基で作製され得る。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リジ

ン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン），非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β－分子側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が挙げられる。従って、ＣＲＦ２－１２中の推定非必須アミノ酸残基は、同一の側鎖ファミリーから別のアミノ酸残基に置換される。あるいは、別の実施形態において、変異は、ＣＲＦ２－１２コード配列の全部または一部の間で無作為に導入され得（例えば、飽和変異誘発によって）、そして、生じた変異体は、活性を維持する変異体を同定するためにＣＲＦ２－１２生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１の変異誘発に続いて、コード化タンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そして、このタンパク質の活性が決定され得る。

【００９３】

１つの実施形態において、変異体ＣＲＦ２－１２タンパク質は、以下についてアッセイされ得る：（１）他のＣＲＦ２－１２タンパク質、他の細胞表面タンパク質、またはその生物学的活性部分とのタンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力；（２）変異体ＣＲＦ２－１２タンパク質とＣＲＦ２－１２レセプターとの間の複合体形成；（３）変異体ＣＲＦ２－１２タンパク質の細胞内標的タンパク質またはその生物学的活性部分（例えば、アビジンタンパク質）への結合能力；（４）ＣＲＦ２－１２タンパク質に結合する能力；（５）抗ＣＲＦ２－１２タンパク質抗体を特異的に結合する能力、または（６）ＩＬ－２２のようなサイトカインポリペプチドに結合する能力。

【００９４】

（アンチセンスＣＲＦ２－１２核酸）

本発明の別の局面は、配列番号１、配列番号３、配列番号５もしくは配列番号１１のヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体を含む核酸分子に対してハイブリダイズ可能かまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に対して相補的である（例えば、２本鎖ｃＤＮＡ分子のコード鎖に対して相補的であるか、またはｍＲＮＡ配列に対して相補的である）ヌクレオチド配列を含む。特定の局面において、少なくとも約１０、２５、５０、１００、２５０もしくは５００ヌクレオチドまたは全ＣＲＦ２－１２コード鎖に対してか、あるいはその一部のみに対して相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。配列番号２、配列番号４または配列番号６のＣＲＦ２－１２タンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、あるいは配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１のＣＲＦ２－１２核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【００９５】

１つの実施形態において、アンチセンス核酸分子は、ＣＲＦ２－１２をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域（例えば、配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２に対応するヒトＣＲＦ２－１２のタンパク質コード領域）をいう。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、ＣＲＦ２－１２をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」は、アミノ酸に翻訳されないコード領域に隣接する５’配列および３’配列をいう（すなわち、５’非翻訳領域および３’非翻訳領域をまたいう）。

【００９６】

本明細書中に開示されるＣＲＦ２－１２をコードするコード鎖配列（例えば、配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１）を考えると、本発明のアンチセンス核酸は、ＷａｔｓｏｎおよびＣｒｉｃｋまたはＨｏｏｇｓｔｅｅｎ塩基対の規定に従って設計

され得る。アンチセンス核酸分子は、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡのコード領域全体に対して相補的であり得るが、より好ましくは、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡのコード領域または非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡの翻訳開始部位周辺の領域に対して相補的であり得る。例えば、アンチセンスオリゴヌクレチドは、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５または５０ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、化学合成を使用するか、または当該分野で公知の手順を使用する酵素的リガンド反応を使用して構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増大するようにか、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成された２本鎖の物理学的安定性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを使用して（例えば、ホスホロチオネート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用され得る）化学的に合成され得る。

【００９７】

アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変ヌクレオチドの例としては、以下が挙げられる：５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アシルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリジン、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルキューオシン、イノシン、Ｎ６－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルキューオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソジン（ｗｙｂｕｔｏｘｏｓｉｎｅ）、シュードウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、５－メチル－２－チオウラシル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル、（ａｃｐ３）ｗおよび２，６－ジアミノプリン。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクローニングされている（すなわち、挿入された核酸から転写されるＲＮＡは、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向を有し、以下の小節にさらに記載される）発現ベクターを使用して生物学的に生成され得る。

【００９８】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的に、被検体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果、それらは、ＣＲＦ２－１２タンパク質をコードする細胞ｍＲＮＡおよび／またはゲノムＤＮＡとハイブリダイズするかまたは結合し、それによって、タンパク質の発現を阻害する（例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって）。ハイブリダイゼーションは、安定な２本鎖を形成するような従来のヌクレオチド相補鎖によるものであり得るか、または例えば、ダブルヘリックスの主要な溝の特異的相互作用を介して、ＤＮＡ二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合においてあり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例として、組織部位での直接注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するために改変され得、次いで、全身的に投与され得る。例えば、全身投与について、アンチセンス分子は改変され得、その結果、それらは選択された細胞表面上で発現されたレセプターまたは抗体に特異的に結合する（例えば、アンチセンス核酸分子を、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによって）。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されるベクターを使用して細胞へ送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なｐｏｌＩＩまたはｐｏ

ｌＩＩＩプロモーターの制御下に配置されるベクター構築物が好ましい。
【００９９】
なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、α－アノマー核酸分子である。α－アノマー核酸分子は、相補的ＲＮＡとの特異的２本鎖ハイブリッドを形成し、通常のβユニットとは反対に、鎖は互いに平行である（Ｇａｕｌｔｉｅｒら（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １５：６６２５～６６４１）。アンチセンス核酸分子はまた、２’－ｏ－メチルリボヌクレオチド（Ｉｎｏｕｅら（１９８７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １５：６１３１～６１４８）、またはキメラＲＮＡ－ＤＮＡアナログ（Ｉｎｏｕｅら（１９８７）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ ２１５：３２７～３３０）を含み得る。
【０１００】
このような改変としては、非制限例として、改変された塩基および糖リン酸骨格が改変されるかまたは誘導体化される核酸が挙げられる。これらの改変は、改変された核酸の化学的安定性を増大するように、少なくとも一部分において実行され得、その結果、これらは、例えば、被験体中の治療的用途におけるアンチセンス結合核酸として使用され得る。
【０１０１】
（ＣＲＦ２－１２リボザイムおよびＰＮＡ部分）
なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、ｍＲＮＡのような一本鎖核酸を切断し得、相補的領域を有するリボヌクレアーゼ活性を有する触媒ＲＮＡ分子である。従って、リボザイム（例えば、（ＨａｓｅｌｈｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５８５－５９１中に記載される）ハンマーヘッドリボザイム）は、ＣＲＦ２－１２ ｍＲＮＡ転写物を触媒的に切断するために使用され得、それによってＣＲＦ２－１２ ｍＲＮＡの転写を阻害する。ＣＲＦ２－１２コード核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示されるＣＲＦ２－１２ ＤＮＡのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１）に基づいて設計され得る。例えば、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ Ｌ－１９ ＩＶＳ ＲＮＡの誘導体は、活性部位の核酸配列が構築され得、ここでＣＲＦ２－１２コードｍＲＮＡ中の切断されるべき核酸配列と相補的である。例えば、Ｃｅｃｈら、米国特許第４，９８７，０７１号；およびＣｅｃｈら、米国特許第５，１１６，７４２号を参照のこと。あるいは、ＣＲＦ２－１２ ｍＲＮＡは、ＲＮＡ分子のプールから、特異的なリボヌクレアーゼ活性を有する、触媒ＲＮＡを選択するために使用され得る。例えば、Ｂａｒｔｅｌら（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１４１１－１４１８を参照のこと。
【０１０２】
あるいは、ＣＲＦ２－１２遺伝子発現は、標的細胞中のＣＲＦ２－１２遺伝子の転写を予防する三重らせん構造を形成するようなＣＲＦ２－１２の調節領域（例えば、ＣＲＦ２－１２プロモーターおよび／またはエンハンサー）に相補的な標的ヌクレオチド配列によって阻害され得る。一般的にＨｅｌｅｎｅ．（１９９１）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ．６：５６９－８４；Ｈｅｌｅｎｅら（１９９２）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．６６０：２７－３６；およびＭａｈｅｒ（１９９２）Ｂｉｏａｓｓａｙｓ １４：８０７－１５を参照のこと。
【０１０３】
多様な実施形態において、ＣＲＦ２－１２の核酸は、改善するように塩基性部分、糖部分またはリン酸骨格を改変し得る（例えば、分子の、安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性）。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するように改変され得る（Ｈｙｒｕｐら（１９９６）Ｂｉｏｏｒｇ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ ４：５－２３を参照のこと）。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「ＰＮＡ」は、核酸擬態（例えば、ＤＮＡ擬態）をいい、これはデオキシリボースリン酸骨格が、シュードペプチド骨格によって置きかえられ、そして４つの天然の核酸塩基のみが残る。ＰＮＡの天然骨格は、低いイオン強度の条件下でＤＮＡおよびＲＮＡを特異的にハイブリダイゼーション可能にすることが示されている。ＰＮＡオリゴマーの合成は、Ｈｙ

ｒｕｐら（１９９６）上記；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅら（１９９６）ＰＮＡＳ ９３：１４６７０－６７５に記載されるような標準固相ペプチド合成プロトコルを使用して実行され得る。

【０１０４】

ＣＲＦ２－１２のＰＮＡは、治療用途および診断用途において使用され得る。例えば、ＰＮＡは、例えば、転写または翻訳停止を誘導するかまたは複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的改変のためのアンチセンス薬剤または抗原薬剤として使用され得る。ＣＲＦ２－１２のＰＮＡはまた、例えば、ＰＣＲクランピングを方向付けるＰＮＡ；他の酵素と組み合わせて用いる場合、人工的な制限酵素（例えば、Ｓ１ヌクレアーゼ（Ｈｙｒｕｐ Ｂ．（１９９６）上記））；またはＤＮＡ配列およびハイブリダイゼーションのプローブまたはプライマーとして（Ｈｙｒｕｐら（１９９６），上記；Ｐｅｒｒｙ－Ｏ’Ｋｅｅｆｅ（１９９６），上記）による、例えば、遺伝子中の単一塩基対の変異の分析において使用され得る。

【０１０５】

別の実施形態において、ＣＲＦ２－１２のＰＮＡは、例えば、それらの安定性または細胞内への取り込みを増強するために、ＰＮＡに対して親油性基または他のヘルパー基を結合することによって、ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの形成によって、あるいはリポソームまたは当業者に公知の薬物送達の他の技術を使用によって改変され得る。例えば、ＰＮＡおよびＤＮＡの有利な特性を組み合わせ得るＣＲＦ２－１２のＰＮＡ－ＤＮＡキメラが、生成され得る。このようなキメラは、ＤＮＡ認識酵素（例えば、ＲＮａｓｅ ＨおよびＤＮＡポリメラーゼがＤＮＡ部分と相互作用するのを可能にする一方で、ＰＮＡ部分は高い結合親和性および特異性を提供するのを可能にする。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基の間での多数の結合および配向の期間において選択される適切な長さのリンカーを用いて、結合され得る（Ｈｙｒｕｐ（１９９６）上記）。ＰＮＡ－ＤＮＡキメラの合成は、上記のＨｙｒｕｐ（１９９６）およびＦｉｎｎら（１９９６）Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２４：３３５７－６３中に記載されるように実行され得る。例えば、ＤＮＡ鎖は、標準ホスホルアミダイトカップリング化学物質を用いて固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば、５’－（４－メトキシトリチル）アミノ－５’－デオキシ－チミジンホスホルアミダイト）は、ＰＮＡとＤＮＡの５’末端との間に使用され得る（Ｍａｇら（１９８９）Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ １７：５９７３－８８）。ＰＮＡモノマーは、次いで５’ＰＮＡセグメントおよび３’ＤＮＡセグメントを用いてキメラ分子を生産するために、段階的な様式でカップリングされる（Ｆｉｎｎら（１９９６）上記）。あるいは、キメラ分子は、５’ＤＮＡセグメントおよび３’ＰＮＡセグメントを用いて合成され得る。Ｐｅｔｅｒｓｅｎら（１９７５）Ｂｉｏｏｒｇ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ Ｌｅｔｔ ５：１１１９－１１１２４を参照のこと。

【０１０６】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下のような他の付加基を含み得る：ペプチド（例えば、インビボでの標的化宿主レセプターに対する）、または細胞膜を通過する輸送を促進する試薬（例えば、Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら、１９８９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８６：６５５３－６５５６；Ｌｅｍａｉｔｒｅら、１９８７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８４：６４８－６５２；ＰＣＴ公開番号Ｗ０８８／０９８１０を参照のこと）または血液脳関門（例えば、ＰＣＴ公開番号Ｗ０８９／１０１３４を参照のこと）。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション標的化切断試薬（例えば、Ｋｒｏｌら、１９８８，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ６：９５８－９７６を参照のこと）または挿入試薬（例えば、Ｚｏｎ，１９８８，Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．５：５３９－５４９を参照のこと）を用いて改変され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション標的化架橋剤、輸送試薬、ハイブリダイゼーション標的化切断試薬など）に結合体化され得る。

【０１０７】

（ＣＲＦ２－１２ポリペプチド）
本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、配列が配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２に提供されるＣＲＦ２－１２様タンパク質を含む。ＣＲＦ２－１２核酸によってコードされるＣＲＦ２－１２ポリペプチドもまた本発明は、本明細書中に開示した。例えば、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、変異体タンパク質または改変体タンパク質を含み、そのＣＲＦ２－１２様活性および生物学的機能を維持するタンパク質をなおコードするが、これらの残基のいずれかがこれらのポリペプチド配列中に示される対応する残基から変化され得るが、そのＣＲＦ２－１２様活性および生理学的機能、またはそれらの機能的フラグメントを維持するタンパク質をさらにコードする。ある実施形態において、２０％以上の残基が、変異体タンパク質または改変体タンパク質中でそのように変化され得る。ある実施形態において、本発明に従うＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、成熟ポリペプチドである。

【０１０８】
一般的に、ＣＲＦ２－１２機能を保持するＣＲＦ２－１２様改変体は、配列中の特定の位置の残基が他のアミノ酸によって置換されている任意の改変体を含み、そしてさらなる残基または親タンパク質の２つの残基の間の残基を挿入する可能性、ならびに親配列から１つ以上の残基を欠損する可能性をさらに含む。任意のアミノ酸置換、挿入または欠損は、本発明によって含まれる。順境において、置換は、上記のような保持的置換である。

【０１０９】
本発明の１つの局面は、単離されたＣＲＦ２－１２タンパク質およびその生物学的に活性な部分、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログに関する。抗－ＣＲＦ２－１２抗体を産生するために免疫原として使用するための適切なポリペプチドフラグメントもまた提供される。１つの実施形態において、ネイティブなＣＲＣ２－１２タンパク質は、標準タンパク質精製技術を用いて、適切な精製スキームによって細胞供給源または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、ＣＲＦ２－１２タンパク質は、組換えＤＮＡ技術によって生産される。組換え発現の代替として、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、標準ペプチド合成技術を用いて化学的に合成され得る。

【０１１０】
「単離された」タンパク質または「精製された」タンパク質あるいはそれらの生物学的に活性な部分は、ＣＲＦ２－１２タンパク質から誘導体化される細胞供給源または組織供給源由来の細胞材料または他の混入タンパク質を実質的に含まず、あるいは化学的に合成された場合、化学的前駆体または他の化学物質から実質的に含まない。用語「細胞材料を実質的に含まない」とは、タンパク質が単離されたまたは組換え生産された細胞の細胞成分から分離されるＣＲＦ２－１２タンパク質の調製物を含む。１つの実施形態において、用語「細胞材料を実質的に含まない」とは、約３０％（乾燥重量で）未満の非ＣＲＦ２－１２タンパク質（「混入タンパク質」としてまた本明細書中で言われる）、より好ましくは約２０％の非ＣＲＦ２－１２タンパク質、なおより好ましくは約１０％未満の非ＣＲＦ２－１２タンパク質、そして最も好ましくは約５％未満の非ＣＲＦ２－１２タンパク質を有するＣＲＦ２－１２タンパク質の調製を含む。ＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分が、組換え生産される場合、好ましくはまた、培養培地を実質的に含まない、すなわち、培養培地は、約２０％未満、より好ましくは約１０％未満、そして最も好ましくは約５％未満のタンパク質調製物の容積を表す。

【０１１１】
用語「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」とは、タンパク質がタンパク質の合成に関する化学的前駆体または他の化学物質から分離されるＣＲＦ２－１２タンパク質の調製物を含む。１つの実施形態において、用語「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、約３０％未満（乾燥重量で）の化学的前駆体もしくは非ＣＲＦ２－１２化学物質、より好ましくは約２０％未満の化学的前駆体もしくは非ＣＲＦ２－１２化学物質、なおより好ましくは約１０％未満の化学的前駆体もしくは非ＣＲＦ２－１

２化学物質、そして最も好ましくは約５％未満の化学的前駆体もしくは非ＣＲＦ２－１２タンパク質化学物質を有するＣＲＦ２－１２タンパク質の調製物を含む。

【０１１２】

ＣＲＦ２－１２タンパク質の生物学的に活性な部分は、ＣＲＦ２－１２タンパク質のアミノ酸配列に十分に相同であるかまたはこれに由来するアミノ酸配列（例えば、全長ＣＲＦ２－１２タンパク質よりも少ないアミノ酸配列を含む、配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２に示されるアミノ酸配列）を含むペプチドを含み、そしてＣＲＦ２－１２タンパク質の少なくとも１つの活性（例えば、ＩＬ－１０またはＩＬ－２２のようなサイトカインへの結合）を示す。代表的には、生物学的に活性な部分は、ＣＲＦ２－１２タンパク質の少なくとも１つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。ＣＲＦ２－１２タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、１０、２５、５０、１００以上のアミノ酸長のポリペプチドであり得る。

【０１１３】

本発明のＣＲＦ２－１２タンパク質の生物学的に活性な部分は、ＣＲＦ２－１２タンパク質間で保存された、少なくとも１つの上記で同定されたドメインを含み得る。さらに、このタンパク質の他の領域が欠失した他の生物学的に活性な部分は、組換え技術を使用して調製され得、そしてネイティブのＣＲＦ２－１２タンパク質の１以上の機能的活性について評価され得る。

【０１１４】

１つの実施形態において、ＣＲＦ２－１２タンパク質は、配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、ＣＲＦ２－１２タンパク質は、配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２に実質的に相同であり、そして配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２のタンパク質の機能的活性を保持するが、なお、以下に詳細に記載するような天然の対立遺伝子バリエーションまたは変異誘発に起因して、アミノ酸配列が異なる。従って、別の実施形態において、ＣＲＦ２－１２タンパク質は、配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２のアミノ酸配列に少なくとも約４５％相同なアミノ酸配列を含み、そして配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２のＣＲＦ２－１２タンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

【０１１５】

本発明のＣＲＦ２－１２ポリペプチドはまた、配列番号２のアミノ酸２１～６２と比較して、そのアミノ酸配列中に１以上（例えば、２、３、５、１０、１５、２０または２５以上）の置換を有するポリペプチドを含む。

【０１１６】

（２つ以上の配列間の相同性を決定する）

２つのアミノ酸配列または２つの核酸の相同性％を決定するために、これらの配列を、最適な比較目的のために整列させる（例えば、これらの配列間の最適なアラインメントのために、比較されている配列のいずれかに、ギャップが導入され得る）。対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドが、次いで比較される。第一の配列中の位置が、第二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で占められる場合、この分子は、その位置で相同である（すなわち、本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である）。

【０１１７】

核酸配列の相同性は、２つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野で公知のコンピュータプログラム（例えば、ＧＣＧプログラムパッケージにおいて提供されるＧＡＰソフトウェア）を使用して決定され得る。ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ １９７０ Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ４８：４４３－４５３を参照のこと。以下の核酸配列比較のための設定（ＧＡＰ生成ペナルティー５．０およびＧＡＰ伸長ペナルティー０．３）を用いて、ＧＣＧ ＧＡＰソフトウェアを使用して、上記で言及されるアナ

ログ核酸配列のコード領域は、配列番号１、配列番号３、配列番号５または配列番号１１に示されるＤＮＡ配列のＣＤＳ（コード）部分と、好ましくは、少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％の同一性の程度を示す。

【０１１８】

用語「配列同一性」は、２つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、比較される特定の領域にわたって、残基毎を基礎として同一である程度をいう。用語「配列同一性の割合」は、比較される領域にわたって２つの最適に整列された配列を比較し、同一な核酸塩基（例えば、核酸の場合、Ａ、Ｔ、Ｃ、Ｇ、ＵまたはＩ）が両方の配列において存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を得て、比較される領域中の全位置数（すなわち、ウインドウサイズ）によって一致した位置の数を除算し、そして結果に１００を乗じて配列同一性の割合を得ることによって計算される。用語「実質的に同一」は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、このポリヌクレオチドは、比較される領域にわたって参照配列と比較した場合、少なくとも８０％の配列同一性、好ましくは少なくとも８５％の同一性、そしてしばしば９０～９５％の配列同一性、より通常は少なくとも９９％の配列同一性を有する配列を含む。用語「ポジティブ残基の割合」は、比較される領域にわたって２つの最適に整列された配列を比較し、上記のように、同一および保存的アミノ酸置換が両方の配列において存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を得て、比較される領域中の全位置数（すなわち、ウインドウサイズ）によって一致した位置の数を除算し、そして結果に１００を乗じてポジティブ残基の割合を得ることによって計算される。

【０１１９】

（キメラタンパク質および融合タンパク質）

本発明はまた、ＣＲＦ２－１２のキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、ＣＲＦ２－１２の「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非ＣＲＦ２－１２ポリペプチドに作動可能に連結したＣＲＦ２－１２ポリペプチドを含む。「ＣＲＦ２－１２ポリペプチド」は、ＣＲＦ２－１２に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、「非ＣＲＦ２－１２ポリペプチド」は、ＣＲＦ２－１２タンパク質に実質的に相同でないタンパク質（例えば、ＣＲＦ２－１２タンパク質とは異なるタンパク質および同じかまたは異なる生物由来のタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有する。ＣＲＦ２－１２融合タンパク質において、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、ＣＲＦ２－１２タンパク質の全てまたは一部に対応し得る。１つの実施形態において、ＣＲＦ２－１２融合タンパク質は、ＣＲＦ２－１２タンパク質の少なくとも１つの生物学的に活性な部分を有する。別の実施形態において、ＣＲＦ２－１２融合タンパク質は、ＣＲＦ２－１２タンパク質の少なくとも２つの生物学的に活性な部分を有する。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結される」は、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドおよび非ＣＲＦ２－１２ポリペプチドが、互いにインフレームで融合していることを示すように意図される。非ＣＲＦ２－１２ポリペプチドは、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端に融合され得る。

【０１２０】

例えば、１つの実施形態において、ＣＲＦ２－１２融合タンパク質は、第二のタンパク質（すなわち、非ＣＲＦ２－１２タンパク質）の細胞外ドメインまたは第二のタンパク質（すなわち、非ＣＲＦ２－１２タンパク質）の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインのいずれかに作動可能に連結されたＣＲＦ２－１２を含む。このような融合タンパク質は、ＣＲＦ２－１２の活性を調節する化合物についてのスクリーニングアッセイにおいてさらに使用され得る（このようなアッセイは、以下に詳細に記載される）。

【０１２１】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、ＣＲＦ２－１２配列がＧＳＴ（すなわち、グルタチオンＳトランスフェラーゼ）配列のＣ末端に融合している、ＧＳＴ－ＣＲＦ２－１２融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、組換えＣＲＦ２－１２の精製を容易にし得る。

【０１２２】
別の実施形態において、この融合タンパク質は、１以上のドメインを含むＣＲＦ２－１２配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバー由来の配列に融合している、ＣＲＦ２－１２－免疫グロブリン融合タンパク質である。
【０１２３】
本発明のＣＲＦ２－１２融合タンパク質（例えば、ＣＲＦ２－１２－免疫グロブリン融合タンパク質）は、薬学的組成物中に組み込まれ、そして被験体に投与されて、細胞表面レセプターとそのリガンドとの間の相互作用を阻害または増大し得る。これは、以下のいずれかによって生じる：１）このレセプターについて利用可能なリガンドに結合し、そして除去する（バイオアベイラビリティーに影響を与えるリガンドの、Ｆｃ媒介性の除去）；２）リガンドに結合し、そしてこのリガンドが細胞レセプターに結合する能力をブロックする（拮抗または中和）；３）別のＣＲＦメンバーと結合し、それによって下流のシグナル伝達カスケードを調節（例えば、阻害）する；４）リガンドまたは別のＣＲＦのいずれかと結合し、リガンドの活性を促進する。これら全ての機構によって、ＣＲＦ２－１２タンパク質を使用して、ＣＲＦ２レセプターとその同族リガンドとの間の相互作用（例えば、ＩＬ－１０とＩＬ－１０レセプターとの間の相互作用、およびＩＬ－２２とＩＬ－２２レセプターとの間の相互作用）を調節し得る。
【０１２４】
ＣＲＦ２－１２リガンド／ＣＲＦ２－１２相互作用の阻害は、サイトカインおよびケモカインカスケード機構の変更による、増殖障害および分化障害（例えば、癌、細胞生存の調節（例えば、促進または阻害））ならびに免疫調節障害、自己免疫、移植および炎症の両方の処置のために、治療的に使用され得る。さらに、本発明のＣＲＦ２－１２－免疫グロブリン融合タンパク質を、免疫原として使用して、被験体における抗ＣＲＦ２－１２抗体を生成し得、ＣＲＦ２－１２リガンドを精製し得、そしてスクリーニングアッセイにおいて、ＣＲＦ２－１２とＣＲＦ２－１２リガンドとの相互作用を阻害する分子を同定し得る。
【０１２５】
本発明のＣＲＦ２－１２のキメラタンパク質または融合タンパク質は、標準的な組換えＤＮＡ技術によって生成され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするＤＮＡフラグメントは、従来技術に従って、インフレームで一緒に連結される（例えば、ライゲーションのための平滑末端またはスタッガー末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合の粘着末端の埋め込み（ｆｉｌｌｉｎｇ－ｉｎ）、所望でない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を使用する）。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化ＤＮＡ合成機を含む従来技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅が、引き続いてアニーリングおよび再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成し得る、２つの連続遺伝子フラグメント間の相補的な突出部を生じるアンカープライマーを使用して、実行され得る（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌら（編）ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆ Ｓｏｎｓ、１９９２を参照のこと）。さらに、すでに融合部分（例えば、ＧＳＴポリペプチド）をコードしている多数の発現ベクターが市販されている。ＣＲＦ２－１２をコードする核酸は、このような発現ベクター中にクローニングされ得、その結果、この融合部分は、ＣＲＦ２－１２タンパク質とインフレームで連結される。
【０１２６】
（ポリペプチドライブラリー）
さらに、ＣＲＦ２－１２タンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーは、ＣＲＦ２－１２タンパク質改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のために、ＣＲＦ２－１２フラグメントの多様化した集団を生成するために使用され得る。１つの実施形態において、コード配列フラグメントのライブラリーは、１分子当たり約１回だけのニックが生じる条件下でヌクレアーゼを用いてＣＲＦ２－１２コード配列のフラグメントの二本鎖ＰＣＲフラグメントを処理し、この二本鎖ＤＮＡを変性させ、このＤＮＡを再生させて異なる

ニックの入った産物由来のセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖ＤＮＡを形成し、Ｓ１ヌクレアーゼ処理によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去し、そして得られたフラグメントのライブラリーを発現ベクター中に連結させることによって、作製され得る。この方法によって、ＣＲＦ２－１２タンパク質のＮ末端および種々の大きさの内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが誘導され得る。

【０１２７】

点変異または短縮によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、および選択された特性を有する遺伝子産物についてｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするための、いくつかの技術が、当該分野で公知である。このような技術は、ＣＲＦ２－１２タンパク質のコンビナトリアル変異誘発によって作製される遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングのために適合性である。大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループットの分析を受け入れる、最も広く使用される技術は、代表的に、複製可能な発現ベクター中に遺伝子ライブラリーをクローニングする工程、得られたベクターのライブラリーを用いて適切な細胞を形質転換する工程、および所望の活性が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させる工程を包含する。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増強する新技術である、再帰集合変異誘発（ｒｅｃｕｒｓｉｖｅ ｅｎｓｅｍｂｌｅ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ）（ＲＥＭ）は、ＣＲＦ２－１２改変体を同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る（ＡｒｋｉｎおよびＹｏｕｒｖａｎ（１９９２）ＰＮＡＳ ８９：７８１１－７８１５；Ｄｅｌｇｒａｖｅら（１９９３）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ６：３２７－３３１）。

【０１２８】

（ＣＲＦ２－１２抗体）

ＣＲＦ２－１２タンパク質またはＣＲＦ２－１２タンパク質のフラグメントに対する抗体もまた、本発明に含まれる。用語「抗体」は、本明細書中で使用される場合、免疫グロブリン（Ｉｇ）分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子をいう。このような抗体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、$Ｆ_{ａｂ}$、$Ｆ_{ａｂ'}$および$Ｆ_{(ａｂ')_2}$フラグメント、ならびに$Ｆ_{ａｂ}$発現ライブラリー。一般に、ヒトから得られる抗体分子は、分子中に存在する重鎖の特徴によって互いに異なるクラス、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＥおよびＩｇＤのいずれかに関する。特定のクラスは、同様にサブクラス（例えば、$ＩｇＧ_1$、$ＩｇＧ_2$など）を有する。さらに、ヒトにおいて、軽鎖は、κ鎖またはλ鎖であり得る。抗体に対する本明細書の言及は、ヒト抗体種の全てのこのようなクラス、サブクラスおよび型に対する言及を含む。

【０１２９】

本発明の単離されたＣＲＦ２－１２関連タンパク質は、抗原またはその一部もしくはフラグメントとして働くように意図され得、そしてさらに、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を使用して、抗原に免疫特異的に結合する抗体を作製するために、免疫原として使用され得る。全長タンパク質が使用され得るか、あるいは本発明は、免疫原としての使用のための、抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号２、配列番号４、配列番号６または配列番号１２に示されるアミノ酸配列）の少なくとも６アミノ酸残基を含み、そしてそれらのエピトープを包含し、その結果、このペプチドに対して惹起された抗体は、全長タンパク質もしくはエピトープを含む任意のフラグメントと特異的免疫複合体を形成する。好ましくは、この抗原性ペプチドは、少なくとも１０アミノ酸残基または少なくとも１５アミノ酸残基または少なくとも２０アミノ酸残基または少なくとも３０アミノ酸残基を含む。この抗原性エピトープに包含される好ましいエピトープは、その表面上に位置するタンパク質の領域であり、一般にこれらは、親水性領域である。

【０１３０】
本発明の特定の実施形態において、抗原性ペプチドに含まれる少なくとも１つのエピトープは、そのタンパク質の表面上に位置するＣＲＦ２－１２関連タンパク質の領域（例えば、親水性領域）である。ヒトＣＲＦ２－１２関連タンパク質配列の疎水性分析は、ＣＲＦ２－１２関連タンパク質のどの領域が特に親水性であるか、従って、抗体産生を標的化するために有用な表面残基をコードする可能性があるかを示す。抗体産生を標的化するための手段として、親水性および疎水性の領域を示すハイドロパシープロットが、当該分野で周知の方法（例えば、フーリエ変換を用いるかまたは用いない、Ｋｙｔｅ　Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅまたは Ｈｏｐｐ　Ｗｏｏｄｓの方法を含む）のいずれかによって作製され得る。例えば、ＨｏｐｐおよびＷｏｏｄｓ、１９８１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：３８２４－３８２８；ＫｙｔｅおよびＤｏｏｌｉｔｔｌｅ　１９８２、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５－１４２（その各々が、本明細書中でその全体が参考として援用される）を参照のこと。抗原性タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログ内の１以上のドメインに特異的な抗体もまた、本明細書中に提供される。

【０１３１】
本発明のタンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログ（ｏｒｔｈｌｏｇ）は、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の作製において、免疫原として使用され得る。

【０１３２】
当該分野で公知の種々の手順は、本発明のタンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログに対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の産生のために使用され得る（例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、Ｈａｒｌｏｗ　ＥおよびＬａｎｅ　Ｄ、１９８８、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。これらの抗体のいくつかを、以下に考察する。

【０１３３】
（ポリクローナル抗体）
ポリクローナル抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物）が、ネイティブなタンパク質、その合成改変体または上記の誘導体を用いる１回以上の注射によって、免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質を示す化学合成ポリペプチド、または組み換え的に発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、このタンパク質は、免疫される哺乳動物において免疫原性であることが知られている第二のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリンおよびダイズトリプシンインヒビター。この調製物は、アジュバントをさらに含み得る。免疫学的応答を増大させるために使用される種々のアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：フロイント（完全または不完全）、鉱物ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性剤（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、ジニトロフェノールなど）、ヒトにおいて使用可能なアジュバント（例えば、カルメット－ゲラン杆菌（Ｂａｃｉｌｌｅ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ）および挫瘡菌（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍ））または同様の免疫刺激剤。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、ＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（モノホスホリルＬｉｐｉｄ　Ａ、合成トレハロースジコリノミコレート（ｄｉｃｏｒｙｎｏｍｙｃｏｌａｔｅ））が挙げられる。

【０１３４】
この免疫原性タンパク質に対するポリクローナル抗体分子は、哺乳動物（例えば、血液）から単離され得、そして周知技術（例えば、プロテインＡまたはプロテインＧを使用する

アフィニティークロマトグラフィー（これは、免疫血清のＩｇＧ画分を主に提供する））によってさらに精製され得る。続いて、またはあるいは、免疫グロブリン探索の標的である特定の抗原またはそのエピトープは、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製するために、カラム上に固定化され得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、Ｄ．Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ（Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｓｔ，Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｓｔ，Ｉｎｃ．、Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ ＰＡにより刊行、第１４巻、第８号（２０００年４月７日）、２５～２８頁）によって考察される。

【０１３５】

（モノクローナル抗体）

本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」（ＭＡｂ）または「モノクローナル抗体組成物」は、特有の軽鎖遺伝子産物および特有の重鎖遺伝子産物からなる抗体分子の１つの分子種のみを含む、抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）は、集団の全ての分子において同一である。従って、ＭＡｂは、抗原結合部位に対する特有の結合親和性によって特徴づけられる抗原の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位を含む。

【０１３６】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法（例えば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）に記載される方法）を用いて調製され得る。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物は、免疫化剤を用いて代表的に免疫化されて、その免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するか、または生成し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビボで免疫化され得る。

【０１３７】

免疫化剤としては、代表的に、タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質が挙げられる。一般に、ヒト起源の細胞が所望される場合、末梢血リンパ球が使用され、または非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合、脾臓細胞もしくはリンパ節細胞が使用される。次いで、リンパ球は、適切な融合剤（例えば、ポリエチレングリコール）を用いて不死化細胞株に融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Ｇｏｄｉｎｇ、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，（１９８６）ｐｐ．５９～１０３）。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞（特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髄腫細胞）である。通常、ラットまたはマウスの骨髄腫細胞株が、用いられる。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合していない不死化細胞の増殖および生存を阻害する１つ以上の物質を含む適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠損する場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的にヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（「ＨＡＴ培地」）を含み、これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の増殖を妨げる。

【０１３８】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支持し、そしてＨＡＴ培地のような培地に感受性の細胞株である。より好ましい不死化細胞株は、マウス骨髄腫株であり、これは、例えば、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ａｎｄ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ，Ｖｉｒｇｉｎｉａから入手可能である。ヒト骨髄種細胞株およびマウス－ヒトヘテロ骨髄腫（ｈｅｔｅｒｏｍｙｅｌｏｍａ）細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の生成について記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，

（１９８７）ｐｐ．５１～６３）。

【０１３９】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降または、インビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または酵素連結免疫吸収アッセイ（ＥＬＩＳＡ））によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野において公知である。例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、ＭｕｎｓｏｎおよびＰｏｌｌａｒｄ，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）のＳｃａｔｃｈａｒｄ分析によって決定され得る。好ましくは、標的抗原に対して高い程度の特異性および高い結合親和性を有する抗体が、単離される。

【０１４０】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンが、限界希釈手順によってサブクローン化され得、そして標準的な方法によって増殖され得る。この目的のための適切な培養培地としては、例えば、Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ’ｓ培地およびＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物における腹水のようにインビボで増殖され得る。

【０１４１】

サブクローン化によって分泌されるモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、プロテインＡ－セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー）によって培養培地または腹水液から単離または精製され得る。

【０１４２】

モノクローナル抗体はまた、組み換えＤＮＡ方法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号に記載される方法）によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることによる）を用いて容易に単離され、そして配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの好ましい供給源として作用する。一旦単離されると、ＤＮＡは、組み換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得るために、発現ベクター中に配置され得、次いでこれは宿主細胞（例えば、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはトランスフェクトしなければ免疫グロブリンタンパク質を生成しない骨髄腫細胞）中にトランスフェクトされる。このＤＮＡはまた、例えば、ヒト重鎖定常ドメインおよびヒト軽鎖定常ドメインについてのコード配列を、相同なマウス配列の代わりに置換することによって（米国特許第４，８１６，５６７号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ ３６８、８１２～１３（１９９４））または非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列の全てもしくは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することによって、改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインと置換され得るか、または本発明の抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインと置換され得キメラ二価抗体を作製し得る。

【０１４３】

（ヒト化抗体）

本発明のタンパク質抗原に対する抗体は、さらにヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。これらの抗体は、投与された免疫グロブリンに対するヒトによる免疫応答を発生させることなくヒトに投与するのに適切である。抗体のヒト化形態は、主にヒト免疫グロブリンの配列から構成され、そして非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$または抗体の他の抗原結合部分配列）である。ヒト化は、げっ歯類のＣＤＲまたはＣＤＲ配列を、対応するヒト抗体の配列と置換することによって、Ｗｉｎｔｅｒおよびその同僚の方法（Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２～５２５（１

９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３～３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４～１５３６（１９８８））に従って実行され得る（米国特許第５，２２５，５３９号もまた参照のこと）。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのＦｖ骨格残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体でも移入されたＣＤＲもしくは骨格配列でも見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、実質的に全体の少なくとも１つ、そして代表的には２つの可変ドメインを含み、ここで、全てまたは実質的に全てのＣＤＲ配列は、非ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ配列に対応し、そして全てまたは実質的に全ての骨格領域は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の骨格領域である。ヒト化抗体はまた、好ましくは免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）（代表的には、ヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ））少なくとも一部のを含む（Ｊｏｎｅｓら、１９８６；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、１９８８；およびＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．，２：５９３～５９６（１９９２））。

【０１４４】

（ヒト抗体）

完全なヒト抗体は、ＣＤＲを含む軽鎖および重鎖の両方の全体の配列が本質的にヒト遺伝子から生じる、抗体分子に関する。このような抗体は、本明細書中で「ヒト抗体」または「完全ヒト抗体」といわれる。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ技術；ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｚｂｏｒら、１９８３ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ ４：７２）およびヒトモノクローナル抗体を生成するＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅら、１９８５ ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ ＡＮＤ ＣＡＮＣＥＲ ＴＨＥＲＡＰＹ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，ｐｐ７７～９６を参照のこと）によって調製され得る。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において利用され得、そしてヒトハイブリドーマを用いることによってか（Ｃｏｔｅら、１９８３．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８０：２０２６～２０３０）またはインビトロでエプスタインバーウイルスを用いてヒトＢ細胞を形質転換することによって（Ｃｏｌｅら、１９８５：ＭＯＮＯＣＬＯＮＡＬ ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ ＡＮＤ ＣＡＮＣＥＲ ＴＨＥＲＡＰＹ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，ｐｐ．７７～９６を参照のこと）生成され得る。

【０１４５】

さらに、ヒト抗体はまた、ファージディスプレーライブラリーを含む、さらなる技術を用いて生成され得る（ＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍおよびＷｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１（１９９１）；Ｍａｒｋｓら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１（１９９１））。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、トランスジェニック動物（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的または完全に不活性化されたマウス）中に導入することによって作製され得る。チャレンジの際に、ヒト抗体生成が観察され、これは遺伝子再配列、アセンブリ、および抗体レパートリーを含む全ての点でヒトにおいて見出されるものに密接に類似する。このアプローチは、例えば、米国特許第５，５４５，８０７号；同第５，５４５，８０６号；同第５，５６９，８２５号；同第５，６２５，１２６号；同第５，６３３，４２５号；同第５，６６１，０１６号；およびＭａｒｋｓら（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０，７７９～７８３（１９９２））；Ｌｏｎｂｅｒｇら（Ｎａｔｕｒｅ ３６８ ８５６～８５９（１９９４））；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ（Ｎａｔｕｒｅ ３６８，８１２～１３（１９９４））；Ｆｉｓｈｗｉｌｄら（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４，８４５～５１（１９９６））；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ（Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４，８２６（１９９６））；ならびにＬｏｎｂｅｒｇおよびＨｕｓｚａｒ（Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３ ６５～９３（１９９５））に記載される。

【０１４６】

ヒト抗体は、抗原によるチャレンジに応答した動物の内因性抗体よりもむしろ完全なヒト抗体を生成するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を用いて、さらに生成さ

れ得る（ＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／０２６０２を参照のこと）。非ヒト宿主において重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子は、不適格であり、そしてヒト重鎖免疫グロブリンおよびヒト軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な遺伝子座が、宿主のゲノム中に挿入される。例えば、ヒト遺伝子は、必須のヒトＤＮＡセグメントを含む酵母人工染色体を用いて組み込まれる。次いで、全ての所望の改変を提供する動物が、トランスジェニック動物の交雑によって子孫として得られ、この中間トランスジェニック動物は、改変の補体を完全には含まない。このような非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、そしてＰＣＴ公開番号ＷＯ９６／３３７３５およびＷＯ９６／３４０９６に開示されるようにＸｅｎｏｍｏｕｓｅ^{TM}といわれる。この動物は、完全なヒト免疫グロブリンを分泌するＢ細胞を生成する。この抗体は、目的の免疫原で免疫化された後、動物から直接得られ得るか（例えば、ポリクローナル抗体の調製として）、あるいは動物由来の不死化Ｂ細胞（例えば、モノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ）から直接得られ得る。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回収され、そして発現され得るか、または抗体のアナログ（例えば、単鎖Ｆｖ分子）を得るためにさらに改変され得る。

【０１４７】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠損した非ヒト宿主（マウスとして例示される）を生成する方法の例は、米国特許第５，９３９，５９８号に開示される。これは、遺伝子座の再配列および再配列された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成を妨げるために、胚幹細胞における少なくとも１つの内因性重鎖遺伝子座由来のＪセグメント遺伝子を欠失することを含む方法によって得られ得、この欠失は、選択マーカーコードする遺伝子を含む標的化ベクターによってもたらされ；そしてその体細胞および生殖細胞が選択マーカーをコードする遺伝子を含むトランスジェニックマウスが、その肺幹細胞から生成される。

【０１４８】

目的の抗体（例えば、ヒト抗体）を生成する方法は、米国特許第５，９１６，７７１号に開示される。これは、重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、培養物中の一方の哺乳動物宿主細胞中に導入する工程、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、別の哺乳動物宿主細胞中に導入する工程、およびこれら２つの細胞を融合してハイブリッド細胞を形成する工程を含む。このハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

【０１４９】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するをエピトープを同定する方法、および高い親和性で関連のエピトープに免疫特異的に結合する抗体を選択する相関的な方法が、ＰＣＴ公開番号ＷＯ９９／５３０４９に開示される。

【０１５０】

（F_{ab}フラグメントおよび単鎖抗体）

本発明に従って、本発明の抗原タンパク質に特異的な単鎖抗体の生成のための技術が、適用され得る（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号を参照のこと）。さらに、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログについて所望の特異性を有するモノクローナルF_{ab}フラグメントの迅速かつ有効な同定を可能にする、F_{ab}発現ライブラリーの構築のための方法が、適用され得る（例えば、Ｈｕｓｅら、１９８９　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４６：１２７５～１２８１を参照のこと）。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントは、当該分野で公知の技術によって生成され得、この抗体フラグメントとしては以下が挙げられるが、これらに限定されない：（ｉ）抗体分子のペプシン消化によって生成される$F_{(ab')_2}$フラグメント；（ｉｉ）$F_{(ab')_2}$フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成されるF_{ab}フラグメント；（ｉｉｉ）パパインおよび還元剤を用いて抗体分子を処理することによって生成されるF_{ab}フラグメント、ならびに（ｉｖ）F_vフラグメント。

【０１５１】

（二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｂｏｄｙ））

二重特異性抗体は、モノクローナル抗体であり、好ましくは、少なくとも２つの異なる抗原に対して結合特異性を有するヒト抗体またはヒト化抗体である。本場合において、結合特異性の１つは、本発明の抗原性タンパク質に関する。２番目の結合標的は、任意の他の抗原であり、そして有利には、細胞表面タンパク質またはレセプターもしくはレセプターサブユニットである。

【０１５２】

二重特異性抗体を作製する方法は、当該分野において公知である。伝統的に、二重特異性抗体の組み換え生成は、２つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づき、ここで、２つの重鎖は、異なる特異性を有する（ＭｉｌｓｔｅｉｎおよびＣｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７～５３９（１９８３））。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の無作為な分別に起因して、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、１０個の異なる抗体分子の可能性のある混合物を生成し、ここでこれらの１つのみが、正確な二重特異的構造を有する。正確な分子の精製は、通常アフィニティーグロマトグラフィー工程によって達成される。類似の手順が、１９９３年5月１３日に公開されたＷＯ９３／０８８２９、およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら、１９９１　ＥＭＢＯ　Ｊ．，１０：３６５５～３６５９に開示される。

【０１５３】

所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体－抗原結合部位）は、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合され得る。この融合は好ましくは、ヒンジ、ＣＨ２、およびＣＨ３領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインと共になされる。少なくとも１つの融合物に存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第１の重鎖定常領域（ＣＨ１）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物をコードするＤＮＡ、および所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするＤＮＡが、別々の発現ベクター中に挿入され、そして適切な宿主生物中で同時発現される。二重特異性抗体を生成するためのさらなる詳細について、例えば、Ｓｕｒｅｓｈら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１２１：２１０（１９８６）を参照のこと。

【０１５４】

ＷＯ９６／２７０１１に記載される別のアプローチに従って、抗体分子の対間の界面は、組み換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するために操作され得る。好ましい界面は、抗体定常ドメインのＣＨ３領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第１の抗体分子の界面に由来する１つ以上の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置換される。大きな側鎖に対する同一または類似のサイズ鎖の代償の「空洞」は、大きいアミノ酸側鎖と小さいアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）とを置換することによって第２の抗体分子の界面に生成される。これは、他の所望でない最終産物（例えば、ホモダイマー）を超えらヘテロダイマーの収率を増加する機構を提供する。

【０１５５】

二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメントとして調製され得る（例えば、$F_{(ab')_2}$二重特異性抗体）。抗体フラグメントからの二重特異性抗体を生成するための技術は、文献中に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製され得る。Ｂｒｅｎｎａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：８１（１９８５）は、インタクトな抗体が、タンパク質分解的に切断されて$F_{(ab')_2}$フラグメントを生成する手順を記載する。これらのフラグメントは、ジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、近隣のジチオールを安定化し、そして分子内ジスルフィド形成を妨げる。次いで、生成された$F_{ab'}$フラグメントが、チオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に転換される。次いで、$F_{ab'}$－ＴＮＢ誘導体の１つが、メルカプトエチルアミンで還元することによって$F_{ab'}$－チオールに再転換され、そして当モル量の他の$F_{ab'}$－ＴＮＢ誘導体と混合されて、二重特異性抗体を形成する。この生成された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための因子として使用され得る。

【０１５６】

さらに、Ｆａｂ’フラグメントは、Ｅ．ｃｏｌｉから直接回収され得、そして化学的にカップリングして二重特異性抗体を形成し得る。Ｓｈａｌａｂｙら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７５：２１７～２２５（１９９２）は、完全にヒト化された二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子の生成を記載する。各Ｆａｂ’フラグメントは、Ｅ．ｃｏｌｉから別々に分泌され、そしてインビトロで指向される化学カップリングに供され、二重特異性抗体を形成した。従って、この形成された二重特異性抗体は、ＥｒｂＢ２レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトＴ細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発し得る。

【０１５７】

組換え細胞培養物から直接二重特異性抗体フラグメントを作製および単離するための種々の技術がまた、記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて生成されている。Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８（５）：１５４７～１５５３（１９９２）。ＦｏｓタンパクおよびＪｕｎタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって異なる２つの抗体のＦａｂ’部分に連結された。この抗体ホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されて、モノマーを形成し、次いで再度酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成した。この方法はまた、抗体ホモダイマーの生成のために利用され得る。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：６４４４～６４４８（１９９３）によって記載される「ジアボディー（ｄｉａｂｏｄｙ）」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作製するための代替の機構を提供している。このフラグメントは、短すぎて同じ鎖の２つのドメインの間で対形成が不可能な、リンカーによって軽鎖可変ドメイン（V_L）に連結された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。従って、１つのフラグメントのV_HドメインおよびV_Lドメインを、別のフラグメントの相補的V_LおよびV_Hドメインと対形成させ、これによって２つの抗原結合部位を形成する。単鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）ダイマーの使用による二重特異性抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーがまた報告されている。Ｇｒｕｂｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：５３６８（１９９４）を参照のこと。

【０１５８】

２つよりも多い結合価を有する抗体が、企図される。例えば、三重特異的抗体が調製される。Ｔｕｔｔら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）。

【０１５９】

例示的な二重特異性抗体は、２つの異なるエピトープに結合し得、それらのエピトープのうちの少なくとも１つは、本発明のタンパク質抗原に由来する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、特定の抗原を発現する細胞に、細胞防御機構を合わせるために、Ｔ細胞レセプター分子（例えば、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ２８またはＢ７）、ＩｇＧに対するＦｃレセプター（ＦｃγＲ）（例えば、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６））のような白血球上の誘因（ｔｒｉｇｇｅｒｉｎｇ）分子と結合するアームと、組合せられ得る。二重特異性抗体をまた使用して、特定の抗原を発現する細胞に細胞傷害性薬剤を方向付けし得る。これらの抗体は、抗原結合アームと、細胞傷害性薬剤または放射性核種キレート剤（例えば、ＥＯＴＵＢＥ、ＤＰＴＡ、ＤＯＴＡまたはＴＥＴＡ）に結合するアームを有する。目的の別の二重特異性抗体は、本明細書中で記載されるタンパク質抗原に結合し、そしてさらに、組織因子（ＴＦ）に結合する。

【０１６０】

（ヘテロ結合体抗体）

ヘテロ結合体抗体もまた、本発明の範囲内にある。ヘテロ結合体抗体は、共有結合された２つの抗体から構成される。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を所望しない細胞に標的化すること（米国特許第４，６７６，９８０号）、そして、ＨＩＶ感染の処置（ＷＯ９１／００３６０；ＷＯ９２／２００３７３；ＥＰ０３０８９）が提唱されている。抗体が合成タンパク質化学において公知の方法（架橋剤を含む方法を含む）を使用してインビトロで調製され得ることが、企図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換

反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって構築され得る。この目的に適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル－４－メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第４，６７６，９８０号中で開示された試薬が挙げられる。

【０１６１】

（エフェクター機能操作）

エフェクター機能に関して、本発明の抗体を、例えば癌の処置における抗体の有効性を増大するために改変することが所望され得る。例えば、システイン残基が、Ｆｃ領域に導入され得、これによって、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成が可能になる。このように生成されたホモダイマー抗体は、改良された内部移行能力および／または増大された補体媒介細胞死滅、ならびに抗体依存性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ）を有し得る。Ｃａｒｏｎら、Ｊ．Ｅｘｐ　Ｍｅｄ．１７６：１１９１～１１９５（１９９２）およびＳｈｏｐｅｓ、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４８：２９１８～２９２２（１９９２）を参照のこと。増大した腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、Ｗｏｌｆｆら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、５３：２５６０～２５６５（１９９３）中に記載のようなヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、二重のＦｃ領域を有する抗体が操作され得、これによって、増大した補体溶解およびＡＤＣＣ能力を有し得る。Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎら、Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ、３：２１９～２３０（１９８９）を参照のこと。

【０１６２】

（免疫結合体）

本発明はまた、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物もしくは動物由来の酵素的活性毒素、またはそのフラグメント）、または放射性同位体（すなわち放射性結合体）のような細胞傷害性薬剤に結合体化された抗体を含む、免疫結合体に関する。

【０１６３】

このような免疫結合体の生成において有用な化学療法剤は、上記されている。使用され得る酵素的活性毒素およびそのフラグメントとしては、以下が挙げられる：ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、菌体外毒素Ａ鎖（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、αサルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩおよびＰＡＰ－Ｓ）、ニガウリインヒビター、カルシン（ｃｕｒｃｉｎ）、クロチン（ｃｒｏｔｉｎ）、ｓａｐａｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓインヒビター、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、マイトジェリン（ｍｉｔｏｇｅｌｌｉｎ）、レストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）、フェノマイシン（ｐｈｅｎｏｍｙｃｉｎ）、エノマイシン（ｅｎｏｍｙｃｉｎ）およびトリコセセネス（ｔｒｉｃｏｔｈｅｃｅｎｅｓ）。種々の放射性核種が、放射性結合体化抗体の生成に利用可能である。例としては、^{212}Ｂｉ、^{131}Ｉ、^{131}Ｉｎ、^{90}Ｙおよび^{186}Ｒｅが挙げられる。

【０１６４】

抗体と細胞障害性薬剤との結合体は、以下のような種々の二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製され得る：Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオール）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、イミノチオレン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体誘導体（例えば、ジメチルアジピミデートＨＣＬ）、活性エステル（例えばジスクシンイミジルスブレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス－アジド化合物（例えば、ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス－ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン（ｔｏｌｙｅｎｅ）２，６－ジイソシアネート）、およびビス活性フッ素化合物（例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼン。例えば、リシン免疫毒素は、Ｖｉｔｅｔｔａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３８：１０９８（１９８７）中に記載のように調製され得る。^{14}Ｃ標識化１－イソチオシアネートベンジル－３－

メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、抗体への放射性ヌクレオチドの結合体化のための例示的なキレート剤である。ＷＯ　９４／１１０２６を参照のこと。

【０１６５】

別の実施形態において、抗体－レセプター結合体が患者に投与され、続いて除去剤を使用して循環から非結合結合体が除去され、次いで、細胞障害性薬剤と結合体化されている「リガンド」（アビジン）が投与されるような腫瘍予備標的化において利用するために、抗体は、「レセプター」（例えばストレプトアビジン）に結合体化され得る。

【０１６６】

（ＣＲＦ２－１２組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、ＣＲＦ２－１２タンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中で使用する場合、用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。ベクターの１つの型は、「プラスミド」であり、これは、さらなるＤＮＡセグメントが連結され得る環状二本鎖ＤＮＡループをいう。ベクターの別の型はウイルスベクターであり、ここで、さらなるＤＮＡセグメントがそのウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクター（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム哺乳動物ベクター）は、これらのベクターが導入される宿主細胞中で自律複製し得る。他のベクター（非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞へ導入する際に、宿主細胞のゲノムへ組み込まれ、これによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、これらのベクターが作動的に連結された遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。本明細書中において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドが、最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、互換可能に使用され得る。しかしながら、本発明は、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルス）のような他の形態の発現ベクター含むことが意図され、これらは、同等の機能を果たす。

【０１６７】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で、本発明の核酸を含み、これは、この組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択された１つ以上の調節配列を含むことを意味し、この調節配列は、発現される核酸配列に作動可能に連結される。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結された」は、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロ転写／翻訳系における、または、ベクターが宿主細胞に導入される場合は宿主細胞における）そのヌクレオチド配列の発現を可能にする様式において、調節配列に連結されることを意味することが意図される。

【０１６８】

用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。このような調節配列は、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ、ＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）中に記載される。調節配列としては、多くの宿主細胞型においてヌクレオチド配列の構成的な発現を指向する調節配列、および特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指向する調節配列（例えば、組織特異的調節配列）が挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現レベルなどのような因子に依存し得ることが、当業者によって理解される。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入し、これによって本明細書中に記載するような核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、ＣＲＦ２－１２タンパク質、ＣＲＦ２－１２タンパク質の変

異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

【０１６９】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞におけるＣＲＦ２－１２タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、ＣＲＦ－２－１２タンパク質は、細菌細胞（例えば、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、酵母細胞または哺乳動物細胞中で発現され得る。適切な宿主細胞はさらに、Ｇｏｅｄｄｅｌ、ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）中で考察される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、Ｔ７プロモーター調節配列およびＴ７ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写され得、そして翻訳され得る。

【０１７０】

原核生物でのタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する、構成型プロモーターまたは誘導型プロモーターを含むベクターを用いて、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉにおいて最もよく実施される。融合ベクターは、多くのアミノ酸を、そのベクター中にコードされているタンパク質に（通常は、組み換えタンパク質のアミノ末端に）付加する。このような融合ベクターは、代表的には以下の３つの目的を果たす：（ｉ）組換えタンパク質の発現を増大すること；（ｉｉ）組換えタンパク質の可溶性を増大すること；および（ｉｉｉ）アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することで、組換えタンパク質の精製に役立つこと。融合発現ベクターにおいて、しばしば、タンパク質切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との接合部に誘導され、融合部分からの組換えタンパク質の分離、続く融合タンパク質の精製が可能となる。このような酵素およびそれらの同族認識配列としては、第Ｘａ因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。代表的な融合発現ベクターとしては、ｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ；ＳｍｉｔｈおよびＪｏｈｎｓｏｎ、１９８８．Ｇｅｎｅ ６７：３１～４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓ）およびｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）が挙げられ、これらは、それぞれ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質またはプロテインＡを標的組換えタンパク質と融合させる。

【０１７１】

適切な誘導型非融合Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターの例としては、ｐＴｒｃ（Ａｍｒａｎｎら、（１９８８）Ｇｅｎｅ ６９：３０１～３１５）およびｐＥＴ１１ｄ（Ｓｔｕｄｉｅｒら、ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）６０～８９）が挙げられる。

【０１７２】

Ｅ．ｃｏｌｉ中での組換えタンパク質発現を最大にするための１つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解性切断する能力に障害がある宿主細菌で、このタンパク質を発現することである。例えば、Ｇｏｔｔｅｓｍａｎ、ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）１１９～１２８を参照のこと。別のストラテジーは、各アミノ酸についての個々のコドンがＥ．ｃｏｌｉで優先的に利用されるコドンとなるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変化させることである（例えば、Ｗａｄａら、１９９２、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０：２１１１～２１１８を参照のこと）。本発明の核酸配列のこのような改変は、標準的ＤＮＡ合成技術によって実施され得る。

【０１７３】

別の実施形態において、ＣＲＦ２－１２発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｉｖｉｓａｅ中で発現するためのベクターの例とし

ては、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉら、１９８７、ＥＭＢＯ Ｊ．６：２２９～２３４）、ｐＭＦａ（ＫｕｒｊａｎおよびＨｅｒｓｋｏｗｉｔｚ、１９８２、Ｃｅｌｌ ３０：９３３～９４３）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｕｌｔｚら、１９８７、Ｇｅｎｅ ５４：１１３～１２３）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）およびｐｉｃＺ（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）が挙げられる。

【０１７４】

あるいは、ＣＲＦ２－１２は、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養された昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、ｐＡｃシリーズ（Ｓｍｉｔｈら、１９８３、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２１５６～２１６５）およびｐＶＬシリーズ（ＬｕｃｋｌｏｗおよびＳｕｍｍｅｒｓ、１９８９、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７０：３１～３９）が挙げられる。

【０１７５】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ、１９８７．Ｎａｔｕｒｅ ３２９：８４０）およびｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎら、１９８７．ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８７～１９５）が挙げられる。哺乳動物中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、通常使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス、およびサルウイルス４０由来である。原核生物細胞および真核生物細胞の両方に適切な他の発現系は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ．第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９の第１６章および第１７章を参照のこと。

【０１７６】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する）。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、以下が挙げられる：アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Ｐｉｎｋｅｒｔら、１９８７、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８～２７７）、リンパ系特異的プロモーター（ＣａｌａｍｅおよびＥａｔｏｎ、１９９８、Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５～２７５）（特に、Ｔ細胞レセプターの特定のプロモーター（ＷｉｎｏｔｏおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ、１９８９、ＥＭＢＯ Ｊ．８：７２９～７３３）および免疫グロブリンの特定のプロモーター（Ｂａｎｅｒｊｉら、１９８３、Ｃｅｌｌ ３３：７２９～７４０；ＱｕｅｅｎおよびＢａｌｔｉｍｏｒｅ、１９８３、Ｃｅｌｌ ３３：７４１～７４８））、ニューロン特異的プロモーター（例えば、神経フィラメントプロモーター；ＢｙｒｎｅおよびＲｕｄｄｌｅ、１９８９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３～５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄら、１９８５、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２～９１６）および乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号および欧州出願公開番号２６４，１６６）。発生により調節されるプロモーター（例えば、マウスｈｏｘプロモーター（ＫｅｓｓｅｌおよびＧｒｕｓｓ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４～３７９）およびαフェトプロテインプロモーター（ＣａｍｐｅｓおよびＴｉｌｇｈｍａｎ、１９８９、Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７～５４６））もまた、含まれる。

【０１７７】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のＤＮＡ分子を含む、組換え発現ベクターを提供する。すなわち、そのＤＮＡ分子は、ＣＲＦ２－１２ ｍＲＮＡに対してアンチセンスであるＲＮＡ分子の（そのＤＮＡ分子の転写による

）発現を可能とする様式において、調節配列に作動的に連結される。アンチセンス方向にクローニングされた核酸に作動的に連結される調節配列（これは、種々の細胞型において、アンチセンスＲＮＡ分子の連続的発現を指向し、例えば、ウイルスプロモーターおよび／もしくはエンハンサーである）が選択され得るか、または、アンチセンスＲＮＡの構成的発現か、組織特異的発現もしくは細胞型特異的な発現を指向する調節配列が、選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、高効率の調節領域の制御下でアンチセンス核酸が生成される、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒ウイルスの形態であり得、これらの活性は、このベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の考察について、例えば、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂら、「Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ ＲＮＡ ａｓ ａ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｔｏｏｌ ｆｏｒ ｇｅｎｅｔｉｃ ａｎａｌｙｓｉｓ」Ｒｅｖｉｅｗｓ－Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｖｏｌ．１（１）１９８６を参照のこと。

【０１７８】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入される宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で互換可能に使用される。このような用語は、特定の対象の細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫もまたいうことが理解される。特定の改変が、変異かまたは環境の影響のいずれかに起因して、後世代で生じ得るので、このような子孫は、実際は、親細胞とは同一ではないかもしれないが、本明細書中で使用するような用語の範囲内に、なお含まれる。

【０１７９】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、ＣＲＦ２－１２タンパク質は、細菌細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、昆虫細胞、酵母細胞、または哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞またはＣＯＳ細胞）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【０１８０】

ベクターＤＮＡは、従来の形質転換技術またはトランスフェクション技術を介して、原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用する場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、異種核酸（例えばＤＮＡ）を宿主細胞に導入するための、当該分野で認知された種々の技術をいうことが意図され、これらとしては、リン酸カルシウム共沈または塩化カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクションまたはエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換するかまたはトランスフェクトするのに適切な方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ．第２版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９），および他の実験説明書中に見出され得る。

【０１８１】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについて、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部分のみが、異種ＤＮＡをそれらのゲノムに組込み得るということは、公知である。これらの組込み体を同定し、そして選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性）をコードする遺伝子が、一般に、目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーとしては、薬剤耐性（例えば、Ｇ４１８、ハイグロマイシンおよびメトトレキサート）を与える選択マーカーが挙げられる。選択マーカーをコードする核酸は、ＣＲＦ２－１２をコードする核酸と同一のベクター上で、宿主細胞に導入され得るか、または、別のベクター上で導入され得る。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬剤選択によって同定され得る（例えば、選択マーカー遺伝子を取りこんだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する）。

【０１８２】

本発明の宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞）を使用して、ＣＲＦ２－１２タンパク質を生成（すなわち発現）し得る。従って、本発明はさら

に、本発明の宿主細胞を使用して、ＣＲＦ２－１２タンパク質を生成する方法を提供する。１つの実施形態において、この方法は、適切な培地中で、本発明の宿主細胞（これに、ＣＲＦ２－１２タンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入される）を、ＣＲＦ２－１２タンパク質が生成されるように培養する工程を包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、培地または宿主細胞からＣＲＦ２－１２タンパク質を単離する工程を包含する。

【０１８３】

（トランスジェニックＣＲＦ２－１２動物）

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、１つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、ＣＲＦ２－１２タンパク質コード配列が導入された受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、外因性ＣＲＦ２－１２配列がそれらのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物または内因性ＣＲＦ２－１２配列が変更された相同組換え動物を作製するために使用され得る。このような動物は、ＣＲＦ２－１２タンパク質の機能および／または活性を研究するため、ならびにＣＲＦ２－１２タンパク質活性のモジュレーターを同定および／または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、その動物の１つ以上の細胞が導入遺伝子を含有する、非ヒト動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、げっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノム中に組込まれ、そして成熟動物のゲノム中に残存する、外因性ＤＮＡであり、それによってトランスジェニック動物の１つ以上の細胞型または組織においてコードされた遺伝子の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、内因性ＣＲＦ２－１２遺伝子が、その動物の発生の前に、内因性遺伝子と動物の細胞（例えば、動物の胚性細胞）中に導入された外因性ＤＮＡ分子との間の相同組換えによって変更された、非ヒト動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、マウスである。

【０１８４】

本発明のトランスジェニック動物は、ＣＲＦ２－１２コード核酸を、受精した卵母細胞のオスの前核中に導入することによって（例えば、微量注入、レトロウイルス感染によって）作製され得、そしてこの卵母細胞を、偽妊娠のメスの養育動物中で発生させることを可能にする。配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１を含む配列は、非ヒト動物のゲノム中に導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトＣＲＦ２－１２遺伝子の非ヒト相同体（例えば、マウスＣＲＦ２－１２遺伝子）は、ヒトＣＲＦ２－１２ｃＤＮＡ（上にさらに記載される）に対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルはまた、導入遺伝子に含有されて、導入遺伝子の発現効率を増加させ得る。組織特異的調節性配列は、特定の細胞に対してＣＲＦ２－１２タンパク質の発現を指向するように、ＣＲＦ２－１２導入遺伝子に作動可能に連結され得る。胚操作および微量注入を介した、トランスジェニック動物、特にマウスのような動物を作製するための方法は、当該分野において慣用的になってきており、そして例えば、米国特許第４，７３６，８６６号；同第４，８７０，００９号；および同第４，８７３，１９１号；ならびにＨｏｇａｎ、１９８６．ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＮＧ ＴＨＥ ＭＯＵＳＥ ＥＭＢＲＹＯ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．中に記載される。同様な方法は、他のトランスジェニック動物の作製について使用され得る。トランスジェニック創始（ｆｏｕｎｄｅｒ）動物は、その動物の組織もしくは細胞におけるゲノムにおけるＣＲＦ２－１２導入遺伝子の存在および／またはＣＲＦ２－１２ ｍＲＮＡの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック創始動物は、導入遺伝子を保有するさらなる動物を育種するために使用され得る。さらに、導入遺伝子がコードするＣＲＦ２－１２タンパク質を保有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を保有する他のトランスジェニック動物に育種され得る

。

【０１８５】

相同組換え動物を作製するために、ベクターが調製され、このベクターは、欠失、付加または置換が導入されたＣＲＦ２－１２遺伝子の少なくとも一部分を含有し、それによって、ＣＲＦ２－１２遺伝子を変更（例えば、機能的に破壊）する。このＣＲＦ２－１２遺伝子は、ヒト遺伝子（例えば、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１のＤＮＡ）であり得るが、より好ましくは、ヒトＣＲＦ２－１２遺伝子の非ヒト相同体である。例えば、配列番号１、配列番号３、配列番号５、または配列番号１１のヒトＣＲＦ２－１２遺伝子のマウス相同体は、マウスゲノムにおいて内因性ＣＲＦ２－１２遺伝子を変更するために適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。１つの実施形態において、ベクターは、相同組換えの際に、内因性ＣＲＦ２－１２遺伝子が、機能的に破壊（すなわち、もはや機能性タンパク質をコードしない；「ノックアウト」ベクターとしても言及される）されるように設計される。

【０１８６】

あるいは、ベクターは、相同組換えの際に、内因性ＣＲＦ２－１２遺伝子が、機能性タンパク質をなおコードするが、変異されるかまたはそうでなければ変更されるように設計され得る（例えば、上流の調節領域が、変更されて、それによって内因性ＣＲＦ２－１２タンパク質の発現を変更し得る）。相同組換えベクターにおいて、ＣＲＦ２－１２遺伝子の変更された部分は、ＣＲＦ２－１２遺伝子のさらなる核酸によって、その５’末端および３’末端に隣接されて、ベクターによって保有される外因性ＣＲＦ２－１２遺伝子と、胚性幹細胞における内因性ＣＲＦ２－１２遺伝子との間で、相同組換えを生じさせ得る。このさらに隣接するＣＲＦ２－１２核酸は、内因性遺伝子と首尾良く相同組換えするために十分な長さの核酸である。典型的に、数千キロベースの隣接ＤＮＡ（５’末端および３’末端の両方）が、ベクター中に含まれる。相同組換えベクターの詳細については、例えば、Ｔｈｏｍａｓら、１９８７．Ｃｅｌｌ　５１：５０３を参照のこと。次いで、このベクターは、胚性幹細胞株中に導入され（例えば、エレクトロポレーションによって）、そして導入されたＣＲＦ２－１２遺伝子が内因性ＣＲＦ２－１２遺伝子と相同的に組換えられた細胞が、選択される。例えば、Ｌｉら、１９９２．Ｃｅｌｌ　６９：９１５を参照のこと。

【０１８７】

次いで、選択された細胞は、動物（例えば、マウス）の胚盤胞中に注入されて、凝集キメラを形成する。例えば、Ｂｒａｄｌｅｙ、１９８７．ＴＥＲＡＴＯＣＡＲＣＩＮＯＭＡＳ　ＡＮＤ　ＥＭＢＲＹＯＮＩＣ　ＳＴＥＭ　ＣＥＬＬＳ：Ａ　ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ　ＡＰＰＲＯＡＣＨ，Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ編、ＩＲＬ，Ｏｘｆｏｒｄ，１１３～１５２頁を参照のこと。次いで、キメラ胚は、適切な偽妊娠のメスの養育動物中に移植され得、そして出産間近までもたらされる。それらの生殖細胞において相同的に組換えられたＤＮＡを保有する子孫は、動物の全ての細胞が、導入遺伝子の生殖系列伝達によって相同的に組換えられたＤＮＡを含む動物を育種するために使用され得る。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築する方法は、Ｂｒａｄｌｅｙ、１９９１．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２：８２３～８２９；ＰＣＴ国際出願番号：ＷＯ９０／１１３５４；ＷＯ９１／０１１４０；ＷＯ９２／０９６８；およびＷＯ９３／０４１６９にさらに記載される。

【０１８８】

別の実施形態において、導入遺伝子の制御された発現を可能にする選択された系を含むトランスジェニック非ヒト動物が、作製され得る。このような系の１つの例は、バクテリオファージＰ１のｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系である。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系の詳細については、例えば、Ｌａｋｓｏら、１９９２．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：６２３２～６２３６を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのＦＬＰリコンビナーゼ系である。Ｏ’Ｇｏｒｍａｎら、１９９１．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５１：１３５１～１３５５

を参照のこと。ｃｒｅ／ｌｏｘＰリコンビナーゼ系が、導入遺伝子の発現を制御するために使用される場合、Ｃｒｅリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を保有する動物が、要求される。このような動物は、「二重（ｄｏｕｂｌｅ）」トランスジェニック動物の構築（例えば、２匹のトランスジェニック動物（一方は、選択されたタンパク質をコードする導入遺伝子を保有し、そして他方は、リコンビナーゼをコードする導入遺伝子を保有する）を交配することによって）を介して提供され得る。

【０１８９】

本明細書中に記載される非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、Ｗｉｌｍｕｔら、１９９７．Ｎａｔｕｒｅ　３８５：８１０～８１３に記載される方法に従って作製され得る。簡潔には、トランスジェニック動物由来の細胞（例えば、体細胞）は、単離され得、そして増殖サイクルを抜け出て、G_0期に入るように誘導され得る。次いで、静止細胞は、例えば、電気的パルスの使用を通じて、静止細胞が単離される同一種の動物に由来する除核した卵母細胞に融合され得る。次いで、再構築された卵母細胞は、これが、桑実胚または未分化胚芽細胞まで発育するように培養され、次いで偽妊娠のメスの養育動物に移される。このメスの養育動物から生まれた子孫は、細胞（例えば、体細胞）が単離された動物のクローンである。

【０１９０】

（薬学的組成物）

本発明のＣＲＦ２－１２核酸分子、ＣＲＦ２－１２タンパク質、および抗ＣＲＦ２－１２抗体（本明細書中において「活性化合物」としても言及される）、ならびにそれらの誘導体、フラグメント、アナログおよびホモログは、投与のために適切な薬学的組成物中に組込まれ得る。このような組成物は、典型的に、核酸分子、タンパク質、または抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含有する。本明細書中において使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与と適合する、任意の溶媒および全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことを企図される。適切なキャリアは、当該分野における標準的な参照テキスト、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（これは、本明細書中にに参考として援用される）の最新版において記載される。このようなキャリアまたは希釈剤の好ましい例としては、水、生理食塩水、フィンガー（ｆｉｎｇｅｒ）溶液、デキストロース溶液、および５％ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リポソームおよび非水性ビヒクル（例えば、不揮発性油）もまた、使用され得る。薬学的に活性な物質に関するこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野において周知である。任意の慣用的な媒体または薬剤が活性化合物と不適合性である範囲以外は、この組成物におけるそれらの使用が、企図される。補助的に活性な化合物もまた、この組成物中に組込まれ得る。

【０１９１】

本明細書中に開示される抗体はまた、免疫リポソーム（ｉｍｍｕｎｏｌｉｐｏｓｏｍｅ）として処方され得る。抗体を含有するリポソームは、例えば、Ｅｐｓｔｅｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２：３６８８（１９８５）；Ｈｗａｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４０３０（１９８０）；ならびに米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号において記載される、当該分野において公知の方法によって調製される。増強された循環時間を有するリポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号中に開示される。

【０１９２】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびＰＥＧ誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を用いた逆相エバポレーション法によって生成され得る。リポソームは、規定された孔径のフィルターを通じて押し出されて、所望される直径を有するリポソームを生成する。本発明の抗体のＦａｂ’フラグメントは、Ｍａｒｔｉｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５７：２８６～２８８（１９８２）に記載されるように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに結合

体化され得る。化学療法剤（例えば、ドキソルビシン（Ｄｏｘｏｒｕｂｉｃｉｎ））は、必要に応じて、リポソーム中に含まれる。Ｇａｂｉｚｏｎら、Ｊ．Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．，８１（１９）：１４８４（１９８９）を参照のこと。

【０１９３】

本発明の薬学的組成物は、その企図される投与経路と適合性であるように処方される。投与経路の例としては、非経口投与（例えば、静脈内、皮内、皮下）、経口投与（例えば、吸入）、経皮投与（すなわち、局所）、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下の適用について使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含有し得る：滅菌した希釈剤（例えば、注入のための水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム）；キレート化剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））；緩衝液（アセテート、シトレートまたはホスフェート）、および張度の調整のための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。ｐＨは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）で調整され得る。非経口的調製物は、ガラスまたはプラスチック製の、アンプル、使い捨て注射器または複数回投与バイアル中に封入され得る。

【０１９４】

注射可能な使用について適切な薬学的組成物としては、滅菌した水溶液（ここで、水溶性）または分散物（ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎ）、および滅菌した注射可能な溶液または分散物の即座（ｅｘｔｅｍｐｏｒａｎｅｏｕｓ）の調製のための滅菌した散剤が挙げられる。静脈内投与について、適切なキャリアとしては、生理食塩水、静菌性水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒｅ ＥＬ™（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）またはリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌でなければならず、そして容易な注射針通過性（ｓｙｒｉｎｇｅａｂｉｌｉｔｙ）が存在する程度まで流動性であるべきである。この組成物は、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保護されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの適切な混合物を含む、溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散物の場合における要求される粒子サイズの維持によって、そして界面活性剤活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の阻止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなど）によって達成され得る。多くの場合において、等張剤（ｉｓｏｔｏｎｉｃ ａｇｅｎｔ）（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール（ｍａｎｉｔｏｌ）、ソルビトール、塩化ナトリウム））を組成物中に含有することが好ましい。注射可能組成物の延長された吸収は、その組成物中に、吸収を遅延する薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を含有させることによってもたらされ得る。

【０１９５】

滅菌した注射可能溶液は、上に列挙した成分の１つ以上の組合わせとともに適切な溶媒中に必要とされる量の活性化合物（例えば、ＣＲＦ２－１２タンパク質または抗ＣＲＦ２－１２抗体）を組込み、必要に応じて、続いて濾過滅菌によって調製され得る。一般的には、分散物は、基本的分散媒体および上に列挙された成分からの必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に活性化合物を組込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌散剤の場合において、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これらは、活性成分に加えて、既に滅菌濾過したその溶液由来の任意のさらなる所望される成分の散剤を生成する。

【０１９６】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含有する。これらは、ゼラ

チンカプセル剤中に入れられるか、または錠剤へと圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、活性化合物は、賦形剤とともに組込まれ、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての使用のために流動性キャリアを用いて使用され得る。ここで、流動性キャリア中の化合物は、経口的に適用され、音を立てられ、そして喀出されるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤および／またはアジュバント物質は、組成物の一部として含有され得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、任意の以下の成分、または同様な性質の化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶性セルロース、トラガカントゴム、またはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、Ｐｒｉｍｏｇｅｌ、またはコーンスターチ）；潤沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはＳｔｅｒｏｔｅ）；滑り剤（ｇｌｉｄａｎｔ）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（蔗糖またはサッカリン）；または香味剤（ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香味剤）。

【０１９７】

吸入による投与について、化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含有する加圧された容器もしくはディスペンサー、または噴霧器からエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【０１９８】

全身性投与はまた、経粘膜（ｔｒａｎｓｍｕｃｏｓａｌ）手段または経皮手段によってであり得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透されるべき障壁に対して適切な浸透剤が、処方物において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野において公知であり、そして例えば、経粘膜投与に対して、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻噴霧または坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮投与について、活性化合物は、一般的に当該分野において公知である、軟膏剤（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、軟膏剤（ｓａｌｖｅ）、ゲル、またはクリーム中に処方される。

【０１９９】

化合物はまた、直腸送達のための、坐剤（例えば、カカオ脂および他のグリセリドのような慣用的な坐剤基剤とともに）または貯留浣腸の形態で調製され得る。

【０２００】

１つの実施形態において、活性化合物は、身体からの急速な排泄に対して化合物を保護するキャリア（例えば、移植物およびマイクロカプセル化送達系を含む制御された放出処方物）とともに調製される。生分解性、生体適合性ポリマー（例えば、酢酸エチレンビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が、使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当業者に明らかである。この物質はまた、Ａｌｚａ　ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎおよびＮｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．から商業的に入手され得る。リポソームの懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により感染細胞に標的化されるリポソームを含む）はまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第４，５２２，８１１号に記載されるような当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【０２０１】

投与の容易さおよび投薬の均一性についての投薬単位形態において、経口組成物または非経口組成物を処方することは、特に有利である。本明細書中において使用される投薬単位形態は、処置されるべき被験体に対する単位投薬量として適切な物理的に別個の単位をいい；各単位は、所定の量に計算された活性化合物を含み、必要とされる薬学的キャリアと共同して所望の治療効果を生じる。本発明の投薬単位形態に関する仕様は、活性化合物の独特な特性および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個体の処置に対してこのような活性化合物を配合する当該分野における固有な制限によって影響され、そしてそれらに依存する。

【０２０２】

本発明の核酸分子は、ベクター中に挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用さ

れ得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（例えば、米国特許第５，３２８，４７０号を参照のこと）によってか、または定位注入（例えば、Ｃｈｅｎら、１９９４．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３０５４～３０５７を参照のこと）によって、被験体に送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが包理される徐放マトリクスを包含し得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが、組換え細胞からインタクトで産生される場合（例えば、レトロウイルスベクター）、この薬学的調製物は、遺伝子送達系を生成する１つ以上の細胞を含み得る。

【０２０３】

本発明のタンパク質および本明細書中で開示されるスクリーニングアッセイによって同定される他の分子を特異的に結合する抗体は、薬学的組成物の形態で種々の障害の処置のために投与され得る。そのような組成物の調製に関する原理および考察、ならびに成分の選択における手引きは、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ Ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ 第１９編（Ａｌｆｏｎｓｏ Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏら、編）Ｍａｃｋ Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．：１９９５；Ｄｒｕｇ Ａｂｓｏｒｐｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ：Ｃｏｎｃｅｐｔｓ，Ｐｏｓｓｉｂｉｌｉｔｉｅｓ，Ｌｉｍｉｔａｔｉｏｎｓ，Ａｎｄ Ｔｒｅｎｄｓ，Ｈａｒｗｏｏｄ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｌａｎｇｈｏｒｎｅ，Ｐａ．，１９９４；およびＰｅｐｔｉｄｅ Ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（Ａｄｖａｎｃｅｓ Ｉｎ Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第４巻），１９９１，Ｍ．Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋに提供される。抗原性タンパク質が細胞内にあり、そして抗体全体がインヒビターとして使用される場合、抗体を内部移行することが好ましい。しかし、リポソームはまた、抗体または抗体フラグメントを細胞に送達するために使用され得る。抗体フラグメントが使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の阻害フラグメントが、好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列を結合する能力を保持するペプチド分子が、設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得、そして／または組換えＤＮＡ技術によって産生され得る。例えば、Ｍａｒａｓｃｏら、１９９３ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：７８８９－７８９３を参照のこと。本明細書中の処方物はまた、処置される特定の指標について必要な１つより多くの活性化合物を含み得、好ましくは、互いに悪影響を与えない相補的活性を有する化合物を含み得る。あるいは、またはさらに、この組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、化学療法剤、または増殖阻害剤）を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で組み合わせて適切に存在する。活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術または界面重合化によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン－マイクロカプセルおよびポリ－（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル）、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマクロエマルジョン中に内包され得る。

【０２０４】

インビボ投与のために使用される処方物は、滅菌されていなければならない。この処方物は、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【０２０５】

徐放性調製物が、調製され得る。徐放性調製物の適切な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、このマトリクスは、成形された物品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリクスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（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－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン－ビニルアセテート、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー（例えば、ＬＵＰＲＯＮ Ｄ

ＥＰＯＴ^{TM}（乳酸－グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成される注入可能なミクロスフェア）、ならびにポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン－ビニルアセテートおよび乳酸－グリコール酸のようなポリマーは、１００日を超えて分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルは、より短い期間タンパク質を放出する。

【０２０６】

薬学的組成物は、投与に関する使用説明書と一緒に、容器、パッケージ、またはディスペンサー中に含まれ得る。

【０２０７】

（スクリーニングおよび検出の方法）

本発明の単離された核酸分子は、（例えば、遺伝子治療適用における宿主細胞での組換え発現ベクターを介して）ＣＲＦ２－１２タンパク質を発現し、（例えば、生物学的サンプル中の）ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２遺伝子における遺伝的損傷を検出し、そして、以下にさらに記載されるように、ＣＲＦ２－１２活性を調節するために使用され得る。さらに、ＣＲＦ２－１２タンパク質は、ＣＲＦ２－１２タンパク質活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするため、およびＣＲＦ２－１２タンパク質の不十分もしくは過剰な産生、またはＣＲＦ２－１２野生型タンパク質と比べて、減少した活性もしくは異常な活性を有するＣＲＦ２－１２タンパク質形態の産生によって特徴付けられる障害を処置するために使用され得る。さらに、本発明の抗ＣＲＦ２－１２抗体は、ＣＲＦ２－１２タンパク質を検出および単離し、そして、ＣＲＦ２－１２活性を調節するために使用され得る。例えば、ＣＲＦ２－１２活性としては、Ｔ細胞またはＮＫ細胞の増殖および分化、抗体産生、ならびに腫瘍増殖が挙げられる。

【０２０８】

本発明はさらに、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤、および上記されるような処置に対するその薬剤の使用に関する。

【０２０９】

（スクリーニングアッセイ）

本発明は、ＣＲＦ２－１２タンパク質に結合するか、または、例えば、ＣＲＦ２－１２タンパク質発現もしくはＣＲＦ２－１２タンパク質活性に対して、刺激効果もしくは阻害効果を有するモジュレーター、すなわち、候補化合物もしくは試験化合物または薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中では、「スクリーニングアッセイ」ともいわれる）を提供する。本発明はまた、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定される化合物を含む。

【０２１０】

１つの実施形態において、本発明は、ＣＲＦ２－１２タンパク質もしくはＣＲＦ２－１２ポリペプチドの膜結合形態またはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはその活性を調節する、候補化合物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法（生物学的ライブラリー；空間的に位置づけ可能な平行固相ライブラリーまたは液相ライブラリー；デコンボリューションを要求する合成ライブラリー法；「１ビーズ１化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法が挙げられる）における任意の多数のアプローチを使用して得られ得る。生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、他の４つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは低分子の化合物ライブラリーに適用可能である。例えば、Ｌａｍ、１９９７．Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ　１２：１４５を参照のこと。

【０２１１】

本明細書に使用される場合、「低分子」は、約５ｋＤ未満の分子量、そして最も好ましくは約４ｋＤ未満の分子量を有する組成物をいうことが意味される。低分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭化水素、脂質または他の有機分子もし

くは無機分子であり得る。化学的混合物および／または生物学的混合物（例えば、真菌抽出物、細菌抽出物、または藻類抽出物）のライブラリーは、当該分野で公知であり、本発明のアッセイのいずれかを用いてスクリーニングされ得る。

【０２１２】

分子ライブラリーの合成に関する方法の例は、技術分野で見出され得、例えば、ＤｅＷｉｔｔら、１９９３．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９０：６９０９；Ｅｒｂら、１９９４．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９１：１１４２２；Ｚｕｃｋｅｒｍａｎｎら、１９９４．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：２６７８；Ｃｈｏら、１９９３．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６１：１３０３；Ｃａｒｒｅｌｌら、１９９４．Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０５９；Ｃａｒｅｌｌら、１９９４．Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．３３：２０６１；およびＧａｌｌｏｐら、１９９４．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３７：１２３３に見出される。

【０２１３】

化合物のライブラリーは、溶液中（例えば、Ｈｏｕｇｈｔｅｎ，１９９２．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１３：４１２－４２１）、またはビーズ上（Ｌａｍ，１９９１．Ｎａｔｕｒｅ　３５４：８２－８４）、チップ上（Ｆｏｄｏｒ，１９９３．Ｎａｔｕｒｅ　３６４：５５５－５５６）、細菌（Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第５，２２３，４０９号）、胞子（Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第５，２２３，４０９号）、プラスミド（Ｃｕｌｌら、１９９２．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：１８６５－１８６９）、もしくはファージ上（ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ，１９９０．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：３８６－３９０；Ｄｅｖｌｉｎ，１９９０．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９：４０４－４０６；Ｃｗｉｒｌａら、１９９０．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８７：６３７８－６３８２；Ｆｅｌｉｃｉ，１９９１．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：３０１－３１０；Ｌａｄｎｅｒ、米国特許第５，２２３，４０９号）に示され得る。

【０２１４】

１つの実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、ここで細胞表面上にＣＲＦ２－１２タンパク質の膜結合形態またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞が、試験化合物と接触させられ、試験化合物のＣＲＦ２－１２タンパク質に結合する能力が、決定される。細胞は、例えば、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。試験化合物のＣＲＦ２－１２タンパク質の結合する能力を決定することは、例えば、試験化合物のＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分への結合が、複合体中の標識された化合物を検出することによって決定され得るように、試験化合物を放射性同位体または酵素標識とカップリングすることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、直接的かまたは間接的かのいずれかで^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、または^{3}Ｈで標識され得、放射性同位体は、放射線放出の直接計数によって、またはシンチレーション計数によって検出される。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで、酵素的に標識され得、酵素的標識を、適切な基質から生成物への変換を決定することによって検出する。１つの実施形態において、このアッセイは、細胞表面にＣＲＦ２－１２タンパク質の膜結合形態またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞をＣＲＦ２－１２を結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、およびＣＲＦ２－１２タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程を包含し、ここで、ＣＲＦ２－１２タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程は、公知の化合物と比べて、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分に優先的に結合する、試験化合物の能力を決定する工程を含む。

【０２１５】

別の実施形態において、アッセイは、細胞表面上にＣＲＦ２－１２タンパク質の膜結合形態またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を、試験化合物とを接触させる工程、およびＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する、試験化合物の能力を決定する工程を包含する細胞ベースのアッ

セイである。ＣＲＦ２－１２またはその生物学的に活性な部分の活性を調節する試験化合物の能力を決定することは、例えば、ＣＲＦ２－１２標的分子に結合するかまたはそれと相互作用するＣＲＦ２－１２タンパク質の能力を決定することによって達成され得る。本明細書中で使用される場合、「標的分子」は、ＣＲＦ２－１２タンパク質が天然で結合または相互作用する分子であり、例えば、ＣＲＦ２－１２相互作用タンパク質を発現する細胞の表面上の分子、第２の細胞の表面上の分子、細胞外環境中での分子、細胞膜の内表面と結合する分子または細胞質分子である。ＣＲＦ２－１２標的分子は、非ＣＲＦ２－１２分子、または本発明のＣＲＦ２－１２タンパク質もしくはポリペプチドであり得る。１つの実施形態において、ＣＲＦ２－１２標的分子は、細胞膜を通りかつ細胞内へ入る細胞外シグナル（例えば、化合物の、膜結合型ＣＲＦ２－１２分子への結合によって発生されたシグナル）の伝達を容易にするシグナル伝達経路の１成分である。この標的は、例えば、触媒活性を有する第２の細胞内タンパク質、または下流シグナル伝達分子のＣＲＦ２－１２との結合を容易にするタンパク質であり得る。

【０２１６】

ＣＲＦ２－１２標的分子に結合するかまたはそれと相互作用するＣＲＦ２－１２タンパク質の能力を決定することは、直接の結合の決定について、上記の方法の１つによって達成され得る。１つの実施形態において、ＣＲＦ２－１２標的分子に結合するまたはそれと相互作用するＣＲＦ２－１２タンパク質の能力を決定することは、標的分子の活性を決定することによって達成され得る。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞内セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内Ca^{2+}、ジアシルグリセロール、IP_3など）の誘導を検出する工程、適切な基質に対する標的の触媒／酵素活性を決定する工程、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に結合されたＣＲＦ２－１２応答性調節要素を含む）の誘導を決定する工程、または細胞応答（例えば、細胞生存、細胞分化、または細胞増殖）を決定する工程によって決定され得る。

【０２１７】

さらに別の実施形態において、本発明のアッセイは、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、およびＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する試験化合物の能力を決定する工程を包含する、無細胞アッセイである。試験化合物のＣＲＦ２－１２タンパク質への結合は、上記されるように直接的または間接的のいずれかで決定され得る。１つのそのような実施形態において、このアッセイは、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分をＣＲＦ２－１２を結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、およびＣＲＦ２－１２タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程を含み、ここで、ＣＲＦ２－１２タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程は、公知の化合物と比べて、ＣＲＦ２－１２またはその生物学的に活性な部分に優先的に結合する、試験化合物の能力を決定する工程を含む。

【０２１８】

なお別の実施形態において、アッセイは、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、およびＣＲＦ２－１２タンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する、試験化合物の能力を決定する工程を包含する、無細胞アッセイである。ＣＲＦ２－１２の活性を調節する試験化合物の能力を決定する工程は、例えば、直接結合を決定するための上記の方法の１つによって、ＣＲＦ２－１２標的分子に結合するＣＲＦ２－１２タンパク質の能力を決定する工程によって達成され得る。代替的な実施形態において、ＣＲＦ２－１２タンパク質の活性を調節する試験化合物の能力を決定することは、ＣＲＦ２－１２標的分子をさらに調節するＣＲＦ２－１２タンパク質の能力を決定する工程によって達成され得る。例えば、適切な基質に対する標的分子の触媒／酵素活性は、上記のように決定され得る。

【０２１９】

さらに別の実施形態において、無細胞アッセイは、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはその

生物学的に活性な部分をＣＲＦ２－１２タンパク質を結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、およびＣＲＦ２－１２タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程を包含し、ここで、ＣＲＦ２－１２タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程は、ＣＲＦ２－１２標的分子に優先的に結合するかまたはその活性を調節するＣＲＦ２－１２タンパク質の能力を決定する工程を含む。

【０２２０】

本発明の無細胞アッセイは、ＣＲＦ２－１２タンパク質の可溶性形態または膜結合形態の両方の使用に扱いやすい。ＣＲＦ２－１２タンパク質の膜結合形態を含む無細胞アッセイの場合、ＣＲＦ２－１２タンパク質の膜結合形態が溶液中に保持されるように可溶化剤を使用することが望ましくあり得る。このような可溶化剤の例としては、ｎ－オクチルグルコシド、ｎ－ドデシルグルコシド、ｎ－ドデシルマルトシド、オクタノイル－Ｎ－メチルグルカミド、デカノイル－Ｎ－メチルグルカミド、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１００、Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）Ｘ－１１４、Ｔｈｅｓｉｔ（登録商標）、イソトリデシポリ（エチレングリコールエーテル）$_n$、Ｎ－ドデシル－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アンモニオ－１－プロパンスルホナート、３－（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ（ａｍｍｉｎｉｏｌ）－１－プロパンスルホナート（ＣＨＡＰＳ）、または３－（３－コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ（ａｍｍｉｎｉｏｌ）－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホナート（ＣＨＡＰＳＯ）のような非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【０２２１】

本発明の上記アッセイ方法の１つより多い実施形態において、タンパク質の１つまたは両方の非複合体形態からの、複合体形態の分離を容易にし、そしてアッセイの自動化を提供するために、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはその標的分子のいずれかを固定することが望ましくあり得る。試験化合物のＣＲＦ２－１２タンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での、ＣＲＦ２－１２タンパク質の標的分子との相互作用は、反応物を含むのに適する任意の容器中で達成され得る。そのような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。１つの実施形態において、１つまたは両方のタンパク質がマトリクスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、ＧＳＴ－ＣＲＦ２－１２融合タンパク質またはＧＳＴ－標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いで、その融合タンパク質を、試験化合物と、または試験化合物および吸着していない標的タンパク質もしくはＣＲＦ２－１２タンパク質のいずれかと併せ、そしてその混合物を、複合体形成を導く条件（例えば、塩およびｐＨに関して生理学的な条件）下でインキュベートする。インキュベーションに続いて、全ての非結合成分を除去するために、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄し、ビーズの場合、マトリクスを固定化し、複合体を、例えば、上記のように、直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、この複合体をマトリクスから解離し得、そして、ＣＲＦ２－１２タンパク質の結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定する。

【０２２２】

マトリクス上にタンパク質を固定するための他の技術はまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、ＣＲＦ２－１２タンパク質またはその標的分子のいずれかは、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合体化を利用して固定化され得る。ビオチン化されたＣＲＦ２－１２タンパク質または標的分子は、当該分野において周知の技術（例えば、ビオチン化キット，Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ）を使用して、ビオチン－ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミド）から調製され得、ストレプトアビジン被覆９６ウェルプレート（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ）のウェル中に固定化される。あるいは、ＣＲＦ２－１２タンパク質または標的分子と反応性の抗体は、その標的分子に対するＣＲＦ２－１２タンパク質の結合を干渉しないが

、プレートのウェルに誘導体化され得、そして非結合標的またはＣＲＦ２－１２タンパク質は、抗体の結合体化によって、ウェルに捕捉され得る。そのような複合体を検出する方法は、ＧＳＴ固定化複合体についての上記方法に加えて、ＣＲＦ２－１２タンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する複合体の免疫検出、およびＣＲＦ２－１２タンパク質または標的分子に結合する酵素活性の検出を頼りにする、酵素結合アッセイを含む。

【０２２３】

別の実施形態において、ＣＲＦ２－１２タンパク質発現の調節因子は、細胞を候補化合物と接触し、そして細胞内のＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の発現を決定する方法において同定される。候補化合物の存在下でのＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の発現レベルは、候補化合物の非存在下でのＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の発現レベルに匹敵する。次いで、この比較に基づいて、候補化合物を、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質発現の調節因子として同定し得る。例えば、候補化合物の存在下で、その非存在下よりも、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の発現が多い（すなわち、統計学的に、有意に高い）場合、この候補化合物は、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の発現の刺激因子として同定される。あるいは、候補化合物の存在下で、その非存在下よりも、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の発現が少ない（統計学的に、有意に低い）場合、この候補化合物は、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の発現のインヒビターとして同定される。この細胞中での、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の発現のレベルは、ＣＲＦ２－１２　ｍＲＮＡまたはＣＲＦ２－１２タンパク質の検出について本明細書中に記載される方法によって、決定され得る。

【０２２４】

本発明のさらに別の局面において、ＣＲＦ２－１２タンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ（例えば、米国特許第５，２８３，３１７号；Ｚｅｒｖｏｓら、１９９３．Ｃｅｌｌ　７２：２２３－２３２；Ｍａｄｕｒａら、１９９３．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１２０４６－１２０５４；Ｂａｒｔｅｌら、１９９３．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１４：９２０－９２４；Ｉｗａｂｕｃｈｉら、１９９３．Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　８：１６９３－１６９６；およびＢｒｅｎｔ　ＷＯ９４／１０３００号を参照のこと）において、「ベイトタンパク質」として使用され得、ＣＲＦ２－１２に結合するかまたはＣＲＦ２－１２と相互作用する他のタンパク質（「ＣＲＦ２－１２結合タンパク質」または「ＣＲＦ２－１２－ｂｐ」）を同定し、そしてＣＲＦ２－１２活性を調節する。そのようなＣＲＦ２－１２結合タンパク質はまた、例えば、ＣＲＦ２－１２経路の上流要素または下流要素として、ＣＲＦ２－１２タンパク質によるシグナルの伝播に関与する可能性がある。

【０２２５】

ツーハイブリッド系は、大部分の転写因子のモジュールの性質に基づき、これは分離可能なＤＮＡ結合ドメインおよび活性化ドメインからなる。簡潔に記すと、このアッセイは２つの異なるＤＮＡ構築物を利用する。一方の構築物において、ＣＲＦ２－１２をコードする遺伝子は、既知の転写因子（例えば、ＧＡＬ－４）のＤＮＡ結合ドメインをコードする遺伝子と融合される。他方の構築物において、未同定のタンパク質（「捕食（ｐｒｅｙ）」または「サンプル」）をコードするＤＮＡ配列（ＤＮＡ配列のライブラリに由来する）は、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子と融合される。この「えさ（ｂａｉｔ）」タンパク質およびこの「捕食」タンパク質がインビボで相互作用してＣＲＦ２－１２依存的な複合体を形成し得る場合、転写因子のＤＮＡ結合ドメインおよび活性化ドメインがきわめて接近させられる。この接近は、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結された、レポーター遺伝子（例えば、ＬａｃＺ）の転写を可能とする。レポーター遺伝子の発現を検出し得、そして機能性の転写因子を包含する細胞コロニーを単離してそして使用して、ＣＲＦ２－１２と相互作用するタンパク質をコードするクローン化された遺伝子を取得し得る。

【０２２６】
本発明はさらに、前述のスクリーニングアッセイにより同定された新規薬剤、および本明細書中に記載されるような処置に対するその使用に関する。
【０２２７】
本発明はさらに、以下の非限定的な実施例において例示される。
【実施例】
【０２２８】
（実施例１：マウスＣＲＦ２－１２配列の単離）
マウスゲノムＤＮＡデータベースおよびＥＳＴ　ＤＮＡデータベースをスクリーニングして、そしてｈＣＲＦ２－１２とのホモロジーを含む特定のクローンを同定した。このホモロジーに基づいて、アミノ末端およびカルボキシ末端のＣＲＦ－２－１２配列をコードする配列を含むマウスの配列を明らかにした。ＯＲＦ－ｍｓ１５－６（ＧＧＡＡＣＴＣＴＧＧＴＴＧＣＣＡＧＡＣＡＡＧＣＡＣＡＣ）（配列番号１３）およびプライマーｍｓ５３－５（ＣＡＡＧＧＡＧＡＧＡＴＧＴＧＴＧＣＡＧＡＴＴＣＣＡＴＧＡの逆向き相補体）（配列番号１４）の５’末端および３’末端に対応するプライマーをそれぞれ、合成してそしてＰＣＲ反応におけるプライマーとして使用した。これらのＰＣＲ反応からのＤＮＡ生成物を、ＴＡクローニングによりｐＣＲＩＩ　ＴＯＰＯベクター中にクローニングして、そしてそれらプラスミドを配列決定した。このＤＮＡ配列およびタンパク質配列を、それぞれ表７および表８に示す。
【０２２９】
（実施例２：ヒトのＣＲＦ２－１２ポリペプチド配列とマウスのＣＲＦ２－１２ポリペプチド配列との間のホモロジー領域の同定）
ヒトＣＲＦ２－１２ポリペプチドおよびマウスＣＲＦ２－１２ポリペプチドのアミノ酸配列を比較した。このアラインメントを以下に提供する。Ｈｅｎｉｋｏｆｆら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）８９：１０９１５－１９，１９９２において記載されるように、アラインメントを調整した。示されるアラインメントについて、ギャップ重さ＝８、平均マッチ＝２．９１２、長さ重さ＝２、平均ミスマッチ＝－２．００３、質＝８２９、長さ＝１１０１、割合＝３．５８９、ギャップ＝１である。その２つのタンパク質が、６９．５６５％類似であり、そして６６．９５７％同一であることを見出した。
【０２３０】
【化１】

```
 832LcaaGlnQuuaLeuLSerSMMPKHCLLGLLI.ILLSSATEIQPARVSLTP 880
                      |||||| || ||   |.     |    || |
  1 ..................MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKP 31
            .         .         .         .         .
881 QKVRFQSRNFHNILHWQAGSSLPSNNSIYFVQYKMYGQSQWEDKVDCWGT 930
    |:|.||||||||||| || | .|  |.|:||||||.||| ||..| |||||
 32 QRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQWKNKEDCWGT 81
            .         .         .         .         .
931 TALFCDLTNETLDPYELYYGRVMTACAGRHSAWTRTPRFTPWWETKLDPP 980
      | ||||.|| |  | |||||  | || :| |. ||||||||||||:|||
 82 QELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPP 131
            .         .         .         .         .
981 VVTITRVNASLRVLLRPPELPNRNQSGKNASMETYYGLVYRVFTINNSLE 1030
    |. ||.|| || |:|  | || | |  || |.| || |.|||| ||||||
132 VMNITQVNGSLLVILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLE 181
            .         .         .         .         .
1031 KEQKAYEGTQRAVEIEGLIPHSSYCVVAEMYQPMFDRRSPRSKERCVQIP 1080
    |||| |||  |||||| | ||||||||||.|||| |||| ||.||||:||
182 KEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPMLDRRSQRSEERCVEIP 231
```

【０２３１】
アラインメントは、２つのタンパク質が６９．５６５％類似であり、そして６６．９５７％同一であることを明かにする。完全な同一性、またはほぼ完全な同一性を、２つのポリペプチドのいくつかの領域について決定する（例えば、アミノ酸ＭＭＰＫＨＣＬ／ＦＬＧＬ／ＦＬＩ（配列番号１３）、アミノ酸ＦＱＳＲＮＦＨＮＩＬＨ／ＱＷＱＡ／ＰＧ（配列番号１４）、アミノ酸ＳＩ／ＶＹＦＶＱＹＫＭ／ＩＹＧＱＳ／ＲＱＷ（配列番号１５）、アミノ酸ＴＰＲＦＴＰＷＷＥＴＫＬ／ＩＤＰＰＶ（配列番号１６）、アミノ酸ＬＶ／ＬＹＲＶＦＴ／ＩＩＮＮＳＬＥＫＥＱＫＡ／ＶＹＥＧ（配列番号１７）、アミノ酸ＲＡＶＥＩＥＧ／ＡＬＩ／ＴＰＨＳＳＹＣＶＶＡＥＭ／ＩＹＱＰＭ（配列番号１８）およびアミノ酸ＤＲＲＳＰ／ＱＲＳＫ／ＥＥＲＣＶＱ／ＥＩＰ（配列番号１９）を含むポリペプチド領域にわたる）。

【０２３２】
（実施例３：ＣＲＦ２－１２ＲＮＡ配列の組織発現パターン）
第１鎖ｃＤＮＡ配列のパネルを含むＯｒｉｇｅｎｅキットを使用して、ＣＲＦ２－１２配列の発現を試験した。ｈＣＲＦ２－１２配列に特異的なプライマーを使用して、ＣＲＦ２－１２配列の存在について、種々の組織由来のＲＮＡを調査した。相対的発現レベルを、「＋」または「－」スコア付けシステムを使用して割り当て、「－」は、ＲＮＡ配列が全く検出されないことを示し、そして「＋＋＋＋」は、高発現を示す。より低度の相対的レベルのＣＲＦ２－１２　ＲＮＡ配列に、「＋」、「＋＋」または「＋＋＋」の可能性あるスコアを割り当てた。

【０２３３】
高レベル（＋＋＋＋）のＣＲＦ２－１２転写物を、胎盤および皮膚の組織において検出した。低～中レベルのＣＲＦ２－１２転写物を、結腸（＋）、前立腺（＋）、小腸（＋＋）および脾臓（＋＋）において検出した。無し～低レベルのＣＲＦ２－１２転写物を、脳、腎臓、肝臓、筋肉、胃、精巣、甲状腺、副腎、膵臓、卵巣、子宮、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）、骨髄、胎児の脳および胎児の肝臓（全て（－））；ならびに心臓または唾液の組織（共に（＋／－））において、検出した。

【０２３４】
これらの結果は、ＣＲＦ２－１２核酸および／またはＣＲＦ２－１２タンパク質を認識するプローブが、ＣＲＦ２－１２配列が高度に発現される組織（例えば、胎盤および皮膚の

組織）を検出することに有用であることを示す。このようなプローブをまた使用して、結腸、前立腺、小腸および脾臓の組織を検出し得る。ＣＲＦ２－１２核酸および／またはＣＲＦ２－１２ポリペプチドを認識するプローブとのハイブリダイゼーションが存在しないことをまた使用して、ＣＲＦ２－１２が発現されない組織（例えば、胃、精巣、甲状腺、副腎、膵臓、卵巣、子宮、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）、骨髄、胎児の脳および胎児の肝臓の組織）の同定を確認し得る。

【０２３５】

（実施例４．ＣＲＦ２－１２核酸配列を含むベクターの構築）

ＴＯＰＯベクターより、ＮｏｔＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素フラグメントとして、マウスＣＲＦ２－１２（ｍＣＲＦ２－１１２）ｃＤＮＡを単離した。このフラグメントをＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｏｔＩ消化したアデノウイルスベクターＡｄｏｒｅ１－２へとサブクローニングした。この構築物を、ｃＤＮＡ挿入物の限定消化分析および配列決定することにより、確認した。このベクターにおいて、ｍＣＲＦ２－１２はサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）前初期プロモーターおよびエンハンサーの制御の下にある。

【０２３６】

この構築物を使用して、ヒト胎児腎臓２９３細胞（ＡＴＣＣ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、Ｍａｒｙｌａｎｄ）における相同組み換えにより、複製不能で、Ｅ１／Ｅ３の除去された、組換え５型（ｄｌ３２７）アデノウイルスを構築する。

【０２３７】

（実施例５：ＣＲＦ２－１２ポリペプチド配列を含む融合タンパク質の構築）

変異を有するマウスＩｇＧ２ａ　Ｆｃドメインと融合された、全てのｍＣＲＦ２－１２ＯＲＦに対応する融合遺伝子から、ＣＲＦ２－１２ポリペプチド配列を含む融合タンパク質を構築した。プライマーを設計してそして使用して、平滑末端ＰＣＲポリメラーゼを使用してＴＯＰＯベクターからｍＣＲＦ２－１２をＰＣＲ反応において増幅する。

【０２３８】

変異を有するマウスＩｇＧ２ａ　Ｆｃドメインと融合された、全てのｍＣＲＦ２－１２ＯＲＦに対応する融合遺伝子を、ＰＣＲが平滑末端ＰＣＲポリメラーゼを使用してＴＯＰＯベクターからｍＣＲＦ２－１２を増幅するプライマーを使用して構築する。５’プライマー（ＶＬ３３４：ＧＡＡＴＴＣＧＴＣＧＡＣＣＣＡＣＣＡＴＧＣＣＴＡＡＧＣＡＴＴＧＣＣＴＴＣ（配列番号３１）は、ｍＣＲＦ２－１２配列の上流のＳａｌＩ部位およびＫｏｚａｋリーダー配列を含む。３’プライマーは、ＶＬ３３５：ＴＧＧＡＡＴＣＴＧＣＡＣＡＣＡＴＣＴＣＴＣＣ（配列番号３２）である。ＰＣＲ産物を、ＳａｌＩを用いて切断して、そしてＳａｌＩおよび平滑ＦｓｐＩ切断したＧａｔｅｗａｙエントリーベクターｐＧ３５２（これは、ＰＣＲ増幅されたｍＣＲＦ２－１２を、インフレームで、変異を有するＩｇＧ２ａ遺伝子のヒンジ領域、ＣＨ２領域およびＣＨ３領域の配列と融合した）とライゲーションした。生じた形質転換は、ｍＣＲＦ２－１２のｍＩｇＧ２ａヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３とのインフレームでの融合を含むプラスミドである。次いで、この融合エントリーベクターを使用して、挿入物をレトロウイルスのＧａｔｅｗａｙ宛先（ｄｅｓｔｉｎａｔｉｏｎ）ベクターｐＧ３４３中にシャトルさせた。ｍＣＲＦ－１２－ＦｃＧ２ａｍ融合遺伝子をコードするレトロウイルスを作製して、そして増幅する細胞株を作製する。

【０２３９】

生じた構築物は、ｍＣＲＦ２－１２のｍＩｇＧ２ａヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３とのインフレームでの融合を含むプラスミドである。次いで、この融合エントリーベクターを使用して、挿入物をレトロウイルスのＧａｔｅｗａｙ宛先ベクターｐＧ３４３中にシャトルする。ｍＣＲＦ－１２－ＦｃＧ２ａｍ融合遺伝子をコードするレトロウイルスを作製して、そして増幅する細胞株を構築する。このウイルスを使用して、疾患の動物モデルにおいて使用される細胞、およびこれらの細胞の養子性の（ａｄｏｐｔｉｖｅ）移入を受け入れる細胞に輸送する。

【０２４０】

（実施例６．ＣＲＦ２－１２核酸配列プローブを使用した、胎盤組織の検出）

胎盤組織を含むことが疑われる生物学的サンプルを用意して、そしてＲＮＡを回収する。そのＲＮＡを、ＣＲＦ２－１２　ＲＮＡサンプルを特異的に検出するプローブと接触させる。ＣＲＦ２－１２　ＲＮＡの存在は、そのサンプルが胎盤組織を含むことを示す。

【０２４１】

（実施例７．ＣＲＦ２－１２核酸配列プローブを使用した、皮膚組織の検出）

皮膚組織を含むことが疑われる生物学的サンプルを用意して、そしてＲＮＡを回収する。そのＲＮＡを、ＣＲＦ２－１２　ＲＮＡサンプルを特異的に検出するプローブと接触させる。サンプル中のＣＲＦ２－１２　ＲＮＡの存在は、そのサンプルが皮膚組織を含むことを示す。

【０２４２】

（実施例８．ＣＲＦ２－１２ポリペプチドを特異的に検出するプローブを使用した、胎盤組織の検出）

胎盤組織を含むことが疑われる生物学的サンプルを用意して、そしてタンパク質を回収する。そのタンパク質を、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドに特異的に結合する抗体プローブと接触させる。サンプル中のＣＲＦ２－１２ポリペプチドの存在は、そのサンプルが胎盤組織を含むことを示す。

【０２４３】

（実施例９．ＣＲＦ２－１２ポリペプチドを特異的に検出するプローブを使用した、皮膚組織の検出）

皮膚組織を含むことが疑われる生物学的サンプルを用意して、そしてタンパク質を回収する。そのタンパク質を、ＣＲＦ２－１２ポリペプチドに特異的に結合する抗体プローブと接触させる。サンプル中のＣＲＦ２－１２ポリペプチドの存在は、そのサンプルが皮膚組織を含むことを示す。

【０２４４】

（実施例１０．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２０に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における２３位のグルタミンは、配列番号２０において対応する位置でアスパラギンに置き換えられる。

【０２４５】

【化２】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTNSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP（配列番号 20）

【０２４６】

（実施例１１．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２１に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における２６位のヒスチジンは、配列番号２１において対応する位置でアルギニンに置き換えられる。

【０２４７】

【化３】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTRESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (配列番号 21)

【０２４８】

（実施例１２．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２２に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における２７位のグルタミン酸は、配列番号２２において対応する位置でアスパラギン酸に置き換えられる。

【０２４９】

【化４】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTH**D**SLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (配列番号 22)

【０２５０】

（実施例１３．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２３に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における２９位のロイシンは、配列番号２３において対応する位置でバリンに置き換えられる。

【０２５１】

【化５】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHE**V**KPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (配列番号 23)

【０２５２】

（実施例１４．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２４に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における３０位のリジンは、配列番号２４において対応する位置でヒスチジンに置き換えられる。

【０２５３】

【化６】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAgTQSTHESL**H**PQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCwGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (配列番号 24)

【０２５４】

（実施例１５．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２５に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における３３位のアルギニンは、配列番号２５において対応する位置でリジンに置き換えられる。

【０２５５】

【化７】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQKVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP（配列番号 25）

【０２５６】

（実施例１６．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２６に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における４０位のアスパラギンは、配列番号２６において対応する位置でグルタミンに置き換えられる。

【０２５７】

【化８】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRQFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP（配列番号 26）

【０２５８】

（実施例１７．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２７に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における４５位のロイシンは、配列番号２７において対応する位置でバリンに置き換えられる。

【０２５９】

【化９】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNIVQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP（配列番号 27）

【０２６０】

（実施例１８．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）

配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２８に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における５２位のアラニンは、配列番号２８において対応する位置でロイシンに置き換えられる。

【０２６１】

【化１０】

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAgTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRLLTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP（配列番号 28）

【０２６２】
（実施例１９．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）
配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号２９に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における５３位のロイシンは、配列番号２９において対応する位置でアラニンに置き換えられる。
【０２６３】
【化１１】
MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRAATGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP（配列番号 29）

【０２６４】
（実施例２０．開示のＣＲＦ２－１２ポリペプチドアミノ酸配列（配列番号２）の配列改変体）
配列番号２のアミノ酸配列から１つのアミノ酸配列で異なるポリペプチド配列を、配列番号３０に示す。改変のアミノ酸配列は、太字で示される。配列番号２に示されるポリペプチド配列における５９位のバリンは、配列番号３０において対応する位置でイソロイシンに置き換えられる。
【０２６５】
【化１２】
MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSIYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP（配列番号 30）

【０２６６】
（他の実施形態）
本発明は、本発明の詳細な記載と連結して記載されたが、前述の記載は本発明を例示し、そしてその範囲を限定しないことを意図するものであり、本発明は添付の特許請求の範囲の範囲により規定される。他の局面、利点および改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/066647 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 5/10, 15/62, C12Q 1/68, C07K 16/18, A61K 38/17, 39/00, 48/00, G01N 33/50, 33/53

(21) International Application Number: PCT/US02/00986

(22) International Filing Date: 14 January 2002 (14.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/261,442	12 January 2001 (12.01.2001)	US
60/267,021	6 February 2001 (06.02.2001)	US
60/270,835	23 February 2001 (23.02.2001)	US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:

US	60/267,021 (CIP)
Filed on	6 February 2001 (06.02.2001)
US	60/261,442 (CIP)
Filed on	12 January 2001 (12.01.2001)
US	60/270,835 (CIP)
Filed on	23 February 2001 (23.02.2001)

(71) Applicant (for all designated States except US): GENETICS INSTITUTE, LLC [US/US]; 87 CambridePark Drive, Cambridge, MA 02140 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): FOUSER, Lynette [US/US]; 57 Hampton Street, Acton, MA 01720 (US). LIU, Wei [CN/US]; 266 Grove Street, #6, Auburndale, MA 02466 (US). DENG, Bijia [US/US]; 38 Coolidge Road, Allston, MA 02134 (US).

(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C., ., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/066647 A2

(54) Title: TYPE 2 CTOKINE RECEPTOR AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME

(57) Abstract: The present invention provides novel isolated CRF2-12 polynucleotides and polypeptides encoded by the CRF2-12 polynucleotides. Also provided are the antibodies that immunospecifically bind to a CRF2-12 polypeptide or any derivative (including fusion derivative), variant, mutant of the CRF2-12 polypeptide, polynucleotide or antibody. The invention additionally provides methods in which the CRF2-12 polypeptide, polynucleotide and antibody are utilized in the detection and treatment of a broad range of pathological states, as well as to other uses.

WO 02/066647 PCT/US02/00986

TYPE 2 CYTOKINE RECEPTOR AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates generally to nucleic acids and polypeptides and more specifically to nucleic acids and polypeptides encoding type II cytokine receptors and extracellular counterparts of Type 2 cytokine receptors, as well as vectors, host cells, antibodies and recombinant methods for producing the polypeptides and polynucleotides.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Cytokines are soluble proteins that influence the growth and differentiation of many cell types. Their receptors are composed of one or more integral membrane proteins that bind the cytokine with high affinity and transduce this binding event to the cell through the cytoplasmic portions of the certain receptor subunits. Cytokine receptors have been grouped into several classes on the basis of similarities in their extracellular ligand binding domains. For example, the receptor chains responsible for binding and/or transducing the effect of interferons (IFNs) are members of the type 2 cytokine receptor family (CRF2), based upon a characteristic 200-250 residue extracellular domain. The demonstrated in vivo activities of these interferons illustrate the clinical potential of, and need for, other cytokines, cytokine agonists, and cytokine antagonists.

Members of the CRF2 family have been reported to act as receptors for a variety of cytokines, including interferon alpha, interferon beta, interferon gamma, IL-10, IL-20, and IL-22. Recently identified members of the CRF2 family are candidate ligands for the IL-10-like molecules IL-19, AK155 and mda-7,

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention is based, in part, upon the discovery of polynucleotide sequences encoding novel members of the CRF2 family.

Accordingly, in one aspect, the invention provides an isolated nucleic acid molecule that includes the sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or

SEQ ID NO:11, or a fragment, homolog, analog or derivative thereof. The nucleic acid can include, *e.g.*, a nucleic acid sequence encoding a polypeptide at least 70%, *e.g.*, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or even 99% or more identical to a polypeptide that includes the amino acid sequences of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12. The nucleic acid can be, *e.g.*, a genomic DNA fragment, or a cDNA molecule.

In some embodiments, the nucleic acid includes 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, or 1500 nucleotides at the 5' side of the sequence including SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11. In some embodiments, the nucleic acid includes 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, or 1500 nucleotides at the 3' side of the sequence including SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11. In other embodiments, the nucleic acid includes 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, or 1500 nucleotides at the 5' and 3' sides of the sequence including SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11.

Also within the invention is a nucleic acid that encodes a polypeptide that includes amino acid sequences 21-66 of SEQ ID NO:2, *e.g.*, a nucleic acids 62-197 of SEQ ID NO:1. Examples of such nucleic acid molecules are those that encode polypeptides with the amino acid sequences of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6, e.g., nucleic acid sequences that include SEQ ID NOs.1, 3, or 5.

In some embodiments, a CRF2-12 nucleic acid of the invention encodes a polypeptide that encodes a polypeptide that includes one or more of the following polypeptide sequences: MMPKHCL/FLG L/FLI, (SEQ ID NO:13), FQSRNFHNILH/QWQ A/PG (SEQ ID NO:14), SI/VYFVQYKM/IYGQS/RQW (SEQ ID NO:15), TPRFTPWWETKL/IDPPV (SEQ ID NO:16), LV/LYRVFT/IINNSLEKEQKA/VYEG (SEQ ID NO:17), RAVEIEG/ALI/TPHSSYCVVAEM/IYQPM (SEQ ID NO:18), and DRRSP/QRSK/EERCVQ/EIP (SEQ ID NO:19).

In some embodiments, the nucleic acid includes 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, or 1500 nucleotides at the 5' side of the sequence encoding a polypeptide that includes amino acid sequences 21-66 of SEQ ID NO:2. In some embodiments, the nucleic acid includes 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, or 1500 nucleotides at the 3' side of the sequence encoding amino acids 21-66 of SEQ ID NO:2. In some

embodiments, the nucleic acid includes 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, or 1500 nucleotides at 5' side and the 3' sides of the sequence encoding amino acids 21-66 of SEQ ID NO:2.

Also included in the invention is a vector containing one or more of the nucleic acids described herein, and a cell containing the vectors or nucleic acids described herein.

The invention is also directed to host cells transformed with a vector comprising any of the nucleic acid molecules described above.

In another aspect, the invention includes a pharmaceutical composition that includes an CRF2-12 nucleic acid and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

In a further aspect, the invention includes a substantially purified CRF2-12 polypeptide, *e.g.*, any of the CRF2-12 polypeptides encoded by an CRF2-12 nucleic acid, and fragments, homologs, analogs, and derivatives thereof. The invention also includes a pharmaceutical composition that includes an CRF2-12 polypeptide and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

In still a further aspect, the invention provides an antibody that binds specifically to an CRF2-12 polypeptide. The antibody can be, *e.g.*, a monoclonal or polyclonal antibody, and fragments, homologs, analogs, and derivatives thereof. The invention also includes a pharmaceutical composition including CRF2-12 antibody and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. The invention is also directed to isolated antibodies that bind to an epitope on a polypeptide encoded by any of the nucleic acid molecules described above.

The invention also includes kits comprising any of the pharmaceutical compositions described above.

The invention further provides a method for producing an CRF2-12 polypeptide by providing a cell containing an CRF2-12 nucleic acid, *e.g.*, a vector that includes an CRF2-12 nucleic acid, and culturing the cell under conditions sufficient to express the CRF2-12 polypeptide encoded by the nucleic acid. The expressed CRF2-12 polypeptide is then recovered from the cell. Preferably, the cell produces little or no endogenous CRF2-12 polypeptide. The cell can be, *e.g.*, a prokaryotic cell or eukaryotic cell.

The invention is also directed to methods of identifying an CRF2-12 polypeptide or nucleic acid in a sample by contacting the sample with a compound that specifically binds to the polypeptide or nucleic acid, and detecting complex formation, if present.

The invention further provides methods of identifying a compound that modulates the activity of an CRF2-12 polypeptide by contacting an CRF2-12 polypeptide with a compound and determining whether the CRF2-12 polypeptide activity is modified.

The invention is also directed to compounds that modulate CRF2-12 polypeptide activity identified by contacting an CRF2-12 polypeptide with the compound and determining whether the compound modifies activity of the CRF2-12 polypeptide, binds to the CRF2-12 polypeptide, or binds to a nucleic acid molecule encoding an CRF2-12 polypeptide.

In another aspect, the invention provides a method of determining the presence of or predisposition of an CRF2-12 -associated disorder in a subject. The method includes providing a sample from the subject and measuring the amount of CRF2-12 polypeptide in the subject sample. The amount of CRF2-12 polypeptide in the subject sample is then compared to the amount of CRF2-12 polypeptide in a control sample. An alteration in the amount of CRF2-12 polypeptide in the subject protein sample relative to the amount of CRF2-12 polypeptide in the control protein sample indicates the subject has a tissue proliferation-associated condition. A control sample is preferably taken from a matched individual, *i.e.*, an individual of similar age, sex, or other general condition but who is not suspected of having a tissue proliferation-associated condition. Alternatively, the control sample may be taken from the subject at a time when the subject is not suspected of having a tissue proliferation-associated disorder. In some embodiments, the CRF2-12 is detected using an CRF2-12 antibody.

In a further aspect, the invention provides a method of determining the presence of or predisposition of an CRF2-12 -associated disorder in a subject. The method includes providing a nucleic acid sample, *e.g.*, RNA or DNA, or both, from the subject and measuring the amount of the CRF2-12 nucleic acid in the subject nucleic acid sample. The amount of CRF2-12 nucleic acid sample in the subject nucleic acid is then compared to the amount of an CRF2-12 nucleic acid in a control sample. An alteration in the amount of CRF2-12 nucleic acid in the sample relative to the amount of CRF2-12 in the control sample indicates the subject has a tissue proliferation-associated disorder.

In a still further aspect, the invention provides a method of treating or preventing or delaying a CRF2-12 -associated disorder. The method includes administering to a subject in which such treatment or prevention or delay is desired an CRF2-12 nucleic acid, an CRF2-12 polypeptide, or an CRF2-12 antibody in an amount sufficient to treat, prevent, or delay a tissue proliferation-associated disorder in the subject. Examples of such disorders include rheumatoid arthritis and multiple sclerosis.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In the case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention is based in part on the discovery of novel nucleic acid sequences encoding a polypeptide showing homology to CRF2 polypeptides. Included in the invention is a 696 nucleotide sequence encoding a soluble CRF2-like polypeptide (see Table 1; SEQ ID NO:1). The amino acid sequences of the encoded polypeptide is shown in Table 2 (SEQ ID NO:2). The predicted open reading frame encodes a 231 amino acid long secreted protein.

Table 1

ATGATGCCTAAACATTGCTTTCTAGGCTTCCTCATCAGTTTCTTCCTTACTGGTGTAGCA
GGAACTCAGTCAACGCATGAGTCTCTGAAGCCTCAGAGGGTACAATTTCAGTCCCGAAAT
TTTCACAACATTTTGCAATGGCAGCCTGGGAGGGCACTTACTGGCAACAGCAGTGTCTAT
TTTGTGCAGTACAAAATATATGGACAGAGACAATGGAAAAATAAAGAAGACTGTTGGGGT

ACTCAAGAACTCTCTTGTGACCTTACCAGTGAAACCTCAGACATACAGGAACCTTATTAC
GGGAGGGTGAGGGCGGCCTCGGCTGGGAGCTACTCAGAATGGAGCATGACGCCGCGGTTC
ACTCCCTGGTGGGAAACAAAAATAGATCCTCCAGTCATGAATATAACCCAAGTCAATGGC
TCTTTGTTGGTAATTCTCCATGCTCCAAATTTACCATATAGATACCAAAAGGAAAAAAAT
GTATCTATAGAAGATTACTATGAACTACTATACCGAGTTTTTATAATTAACAATTCACTA
GAAAAGGAGCAAAAGGTTTATGAAGGGGCTCACAGAGCGGTTGAAATTGAAGCTCTAACA
CCACACTCCAGCTACTGTGTAGTGGCTGAAATATATCAGCCCATGTTAGACAGAAGAAGT
CAGAGAAGTGAAGAGAGATGTGTGGAAATTCCATGA (SEQ ID NO:1)

Table 2

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVY
FVQYKIYGQRQWKNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRF
TPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLVILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSL
EKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPMLDRRSQRSEERCVEIP
(SEQ ID NO: 2)

Also included in the invention is a 792-nucleotide sequence encoding a soluble CRF2-like polypeptide (see Table 3; SEQ ID NO:3). While not wishing to be bound by theory, it is believed that the nucleotide sequence in Table 3 is the result of alternative splicing of the RNA transcribed from the CRF2-12 gene that also encodes the nucleotide sequence in Table 1. The amino acid sequences of the polypeptide encoded by the nucleotide sequence shown in Table 3 is shown in Table 4 (SEQ ID NO:4). The predicted open reading frame codes for a 263 amino acid long secreted protein. The nucleotide sequence of Table 3 has an extra exon of 96 nucleotides as compared to the nucleotide sequence shown in Table 1. The extra exon encodes a polypeptide that includes 32 amino acids not present in the polypeptide sequence shown in Table 2.

Table 3

ATGATGCCTAAACATTGCTTTCTAGGCTTCCTCATCAGTTTCTTCCTTACTGGTGTAGC
AGGAACTCAGTCAACGCATGAGTCTCTGAAGCCTCAGAGGGTACAATTTCAGTCCCGAA

ATTTTCACAACATTTTGCAATGGCAGCCTGGGAGGGCACTTACTGGCAACAGCAGTGTC
TATTTTGTGCAGTACAAAATCATGTTCTCATGCAGCATGAAAAGCTCTCACCAGAAGCC
AAGTGGATGCTGGCAGCACATTTCTTGTAACTTCCCAGGCTGCAGAACATTGGCTAAAT
ATGGACAGAGACAATGGAAAAATAAAGAAGACTGTTGGGGTACTCAAGAACTCTCTTGT
GACCTTACCAGTGAAACCTCAGACATACAGGAACCTTATTACGGGAGGGTGAGGGCGGC
CTCGGCTGGGAGCTACTCAGAATGGAGCATGACGCCGCGGTTCACTCCCTGGTGGGAAA
CAAAAATAGATCCTCCAGTCATGAATATAACCCAAGTCAATGGCTCTTTGTTGGTAATT
CTCCATGCTCCAAATTTACCATATAGATACCAAAAGGAAAAAAATGTATCTATAGAAGA
TTACTATGAACTACTATACCGAGTTTTTATAATTAACAATTCACTAGAAAAGGAGCAAA
AGGTTTATGAAGGGGCTCACAGAGCGGTTGAAATTGAAGCTCTAACACCACACTCCAGC
TACTGTGTAGTGGCTGAAATATATCAGCCCATGTTAGACAGAAGAAGTCAGAGAAGTGA
AGAGAGATGTGTGGAAATTCCATGA (SEQ ID NO:3)

Table 4

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSV
YFVQYKIMFSCSMKSSHQKPSGCWQHISCNFPGCRTLAKYGQRQWKNKEDCWGTQELSC
DLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLVI
LHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSS
YCVVAEIYQPMLDRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:4)

Also within the invention is a nucleic acid shown in Table 5. While not wishing to be bound by theory, it is believed that the nucleotide sequence in Table 5 is the result of alternative splicing of RNA transcribed from the CRF2-12 gene that also encodes the nucleotide sequences in Table 1 and 3. The disclosed nucleic acid encodes a polypeptide having the amino acid sequence shown in Table 6. As a result of alternative splicing that skips an exon and changes the frame of translation in the final exon, the amino acid sequence shown in Table 6 is shorter than the protein sequence in Table 2 and contains unique amino acids at its carboxy terminus.

Table 5

ATGATGCCTAAACATTGCTTTCTAGGCTTCCTCATCAGTTTCTTCCTTACTGGTGTAGCAGGAACT
CAGTCAACGCATGAGTCTCTGAAGCCTCAGAGGGTACAATTTCAGTCCCGAAATTTTCACAACATT
TTGCAATGGCAGCCTGGGAGGGCACTTACTGGCAACAGCAGTGTCTATTTTGTGCAGTACAAAATA
TATGGACAGAGACAATGGAAAAATAAAGAAGACTGTTGGGGTACTCAAGAACTCTCTTGTGACCTT
ACCAGTGAAACCTCAGACATACAGGAACCTTATTACGGGAGGGTGAGGGCGGCCTCGGCTGGGAGC
TACTCAGAATGGAGCATGACGCCGCGGTTCACTCCCTGGTGGGAAAGAGCAAAAGGTTTATGA
(SEQ ID NO:5)

Table 6

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKI
YGQRQWKNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWERAKGL
(SEQ ID NO:6)

CRF2-like nucleic acids and polypeptides of the invention (including those shown in Tables 1-6) are referred to herein as "CRF2-12 " nucleic acids and polypeptides.

The three disclosed CRF2-12 nucleic acids and encoded polypeptides share common sequences that correspond to two putative exons in a CRF2-12 gene. One includes an exon corresponding to exons 1-61 of SEQ ID NO:1. A second exon corresponds to nucleotides 62-197 of SEQ ID NO:1. These sequences are present in all the disclosed CRF2-12 nucleic acid sequences. Accordingly, a CRF2-12 nucleic acid can include one or both of these exons, and a CRF2-12 polypeptide can include the polypeptide sequence encoded by one or both of these exons. For example, included in the invention are CRF2-12 nucleic acids encoding polypeptides that include sequences homologous to amino acids 21-66 of SEQ ID NO:2, *e.g.*, nucleic acids including nucleotides 62-197 of SEQ ID NO:1. Also within the invention are polypeptides that include sequences homologous to amino acids 21-66 of SEQ ID NO:2. Also included in the invention are CRF2-12 nucleic acids encoding polypeptides that include sequences homologous to amino acids 1-61 of SEQ ID NO:2, *e.g.*, nucleic acids including nucleotides 1-61 of SEQ ID NO:1. Also within the invention are polypeptides that include sequences homologous to amino acids 1-61 of SEQ ID NO:2.

The sequences disclosed in Tables 1 and 2 were identified using a Hidden Markov model (HMM) constructed for the type II cytokine receptor family proteins. This HMM model was then used to search protein and nucleotide databases. The nucleic acid shown in Table 1 was assembled based on the compiled sequences.

A cDNA corresponding to the nucleic acid sequence shown Table 1 was identified using PCR amplification. PCR primers used included 5' CTTGCAACCATGATGCCTAAACATTGC (SEQ ID NO:5) or ATGATGCCTAAACATTGCTTTCTAGG (SEQ IDNO:6) and 3' (TCATGGAATTTCCACACATCTCTCTTCAC) (SEQ ID NO:7).

The primers were used to amplify cDNA species from a cDNA library. The RNA used to prepare the library was isolated from a mixed lymphocyte culture activated with PHA and PMA. A major species of ~700-750 bp was obtained after 40 cycles from five separate PCR reactions using the Clontech Advantage PCR kit. These five fragments were purified from preparative agarose gels using Sigma GenElute Minus EtBr Spin Columns. The fragments were subsequently ligated into Invitrogen vector pCR2.1 using the Invitrogen TA cloning kit. White transformants were obtained using Invitrogen TOPO 10 One Shot Chemical Transformation in conjunction with X-gal screening. Thirty white colonies were picked (six colonies from each transformation corresponding to an original 'PCR reaction') for culturing overnight in LB with ampicillin. Qiagen Spin Column Minipreps were done on 4.5 ml of cell culture and the subsequent DNA analyzed for inserts using EcoR1 restriction enzyme and agarose electrophoretic evaluation. Twenty three clones were evaluated for presence of an insert sequence. Three clones contained inserts having the nucleotide sequence shown in Table 1.

The polypeptide shown in Table 2 is the first member of the CRF2 family that does not contain a transmembrane domain. Thus, this polypeptide is likely secreted from a cell. The encoded ORF has the highest homology to ZcytoR7, ZcytoR 11 and tissue factor. The polypeptide shown in Table 2 also shows high similarity to previously described class II cytokine receptors. The relatedness to previously described cytokine receptor factors is shown below.

Matching Entry (in SwissProt + SpTrEMBL)	Begin-End	Description	Score	E Value
Q9YGC8	[30-227]	INTERLEUKIN-10 RECEPTOR 2.	73.4	1e-12
I10R_MOUSE	[31-149]	INTERLEUKIN-10 RECEPTOR PRECURSOR (IL-10R).	63.6	1e-09
I10S_MOUSE	[6-227]	INTERLEUKIN-10 RECEPTOR BETA CHAIN PRECURSOR (IL-10R-B) (IL-10R2) (CYTOKINE RECEPTOR CLASS-II CRF2-4).	62.8	2e-09

I10S_MOUSE	[6-227]	INTERLEUKIN-10 RECEPTOR BETA CHAIN PRECURSOR (IL-10R-B) (IL-10R2) (CYTOKINE RECEPTOR CLASS-II CRF2-4).	62.8	2e-09
INR1_BOVIN	[22-209] [24-207]	INTERFERON-ALPHA/BETA RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR (IFN-ALPHA-REC).	62.5	2e-09
TF_HUMAN	[11-228]	TISSUE FACTOR PRECURSOR (TF) (COAGULATION FACTOR III) (THROMBOPLASTIN) (CD142 ANTIGEN).	61.7	4e-09
CRF4_HUMAN	[31-227]	CYTOKINE RECEPTOR CLASS-II CRF2-4 PRECURSOR.	61.7	4e-09
Q9YHW0	[31-229] [22-228]	INTERFERON ALPHA/BETA RECEPTOR 1.	59.3	2e-08
INR1_MOUSE	[27-228]	INTERFERON-ALPHA/BETA RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR (IFN-ALPHA-REC).	58.9	3e-08
I10R_HUMAN	[1-230]	INTERLEUKIN-10 RECEPTOR PRECURSOR (IL-10R).	57.0	1e-07
TF_BOVIN	[11-167]	TISSUE FACTOR PRECURSOR (TF) (COAGULATION FACTOR III).	55.0	4e-07
INR1_SHEEP	[24-207] [22-209]	INTERFERON-ALPHA/BETA RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR (IFN-ALPHA-REC) (INTERFERON ALPHA/BETA RECEPTOR-1).	54.3	7e-07
INR1_HUMAN	[31-207] [36-227]	INTERFERON-ALPHA/BETA RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR (IFN-ALPHA-REC).	54.3	7e-07
INGR_HUMAN	[10-230]	INTERFERON-GAMMA RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR (CDW119).	51.2	6e-06
Q9YHV9	[31-228]	INTERFERON ALPHA/BETA RECEPTOR 2.	49.2	2e-05

TF_RABIT	[11-144]	TISSUE FACTOR PRECURSOR (TF) (COAGULATION FACTOR III).	48.4	4e-05
TF_RAT	[7-145]	TISSUE FACTOR PRECURSOR (TF) (COAGULATION FACTOR III).	47.6	6e-05

The extent of the relatedness between the polypeptide shown in Table 2 and previously described type 2 cytokine receptor polypeptides ranges from 21%-34% identity. 40 to 47% of the amino acids are related as positive amino acids.

An alignment between the Q9YGC8 gallus gallus (chicken) interleukin-10 receptor 2 (5/1999) and amino acids 30-227 of the amino acid sequence shown in Table 2 is provided below. For the alignment shown, length = 341, Score = 73.4, bits (177.0), Expect = $1e^{-12}$, identities = 56/200 (28%), and positives = 92/200, (46%).

```
Query: 30 KPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQWKNKEDCWGTQELSCDL 88
          KP+  +  S NF ++L W P     GN S Y VQ K I+ ++ + N         E CD+
Sbjct: 23 KPRNARISSVNFRSVLLWDPPGVRKGNLS-YTVQAKSIFPKQNFNNVTTNLNVTE--CDV
79

Query: 89 TSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLVILHA
148
          +S    +   Y  RVR      +S+W++  RF P  +T I PP +N+   +G+L V
Sbjct: 80  SS--LSVYGAYVLRVRTEWEDEHSDWAVV-RFKPMADTVIGPPSVNVKSESGTLHVDFTG
136

Query: 149 PNLPYRYQKEKNVSIEDYY-ELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCV
207
           P     + K    S++ YY   +YR+          K+     +  H +  +  L P + YC+
Sbjct: 137 PAADREHDK---WSLKQYYGSWIYRILYWKKGSNKKVIHIDTKHNSEILSQLEPWTIYCI
193

Query: 208 VAEIYQPMLDRRSQRSEERC 227
              +   P  ++  +RS+E C
Sbjct: 194 QVQGVIPEWNKTGERSQELC 213
```

Additional CRF2-13 coding sequences were identified in PCR amplification assays using primers ATGATGCCTAAACATTGCTTTCTAGG (SEQ ID NO:9) and TCATGGAATTTCCACACATCTCTCTTCAC (SEQ ID NO:10). A cDNA containing the sequence presented in Table 3 was identified in pooled cDNA derived from a variety of human tissues. A cDNA containing the sequence presented in Table 5 was identified in a cDNA library derived from stomach tissue. The same ligation, transformation, screening and sequencing methods used for cloning DNA shown in Table 1 were used to produce a cDNA that includes the sequences that are presented in Tables 3 and 5.

A murine nucleotide sequence encoding a CRF2-12 polypeptide of the invention is shown in Table 7.

Table 7

GGAACTCTGGTTGCCAGACAAGCACACTTGCAACCATGATGCCTAAGCATTGCCTTCTAGGTCTCCTCATCA
TACTCTTGAGCAGTGCAACAGAAATACAACCAGCTCGTGTATCTCTGACGCCCCAGAAGGTCCGATTTCAGT
CCAGAAATTTCCACAATATTTTGCACTGGCAAGCAGGGAGCTCTCTCCCCAGCAACAACAGCATCTACTTTG
TGCAGTACAAGATGTATGGACAGAGCCAATGGGAAGATAAAGTTGACTGCTGGGGGACCACGGCGCTCTTCT
GTGACCTGACCAATGAAACCTTAGACCCATACGAGCTGTATTACGGGAGGGTGATGACGGCCTGTGCTGGAC
GCCACTCTGCCTGGACCAGGACACCCCGCTTCACTCCATGGTGGGAAACAAAACTAGATCCTCCGGTCGTGA
CTATAACCCGAGTTAACGCATCTTTGCGGGTGCTTCTCCGTCCTCCAGAGTTGCCAAATAGAAACCAAAGTG
GAAAAAATGCATCCATGGAAACTTACTACGGCTTAGTATACAGAGTTTTCACAATCAACAATTCACTAGAGA
AGGAGCAAAAAGCCTATGAAGGGACTCAGAGAGCTGTTGAAATTGAAGGTCTGATACCTCATTCCAGCTACT
GCGTAGTGGCTGAAATGTACCAGCCCATGTTTGACAGAAGAAGCCCAAGAAGCAAGGAGAGATGTGTGCAGA
TTCCATGA (SEQ ID NO:11)

The nucleotide sequence shown in Table 7 encodes a polypeptide of 230 amino acids having the amino acid sequence shown in Table 8.

Table 8

MMPKHCLLGLLIILLSSATEIQPARVSLTPQKVRFQSRNFHNILHWQAGSSLPSNNSIYFVQYKMYGQSQWE
DKVDCWGTTALFCDLTNETLDPYELYYGRVMTACAGRHSAWTRTPRFTPWWETKLDPPVVTITRVNASLRVL
LRPPELPNRNQSGKNASMETYYGLVYRVFTINNSLEKEQKAYEGTQRAVEIEGLIPHSSYCVVAEMYQPMFD
RRSPRSKERCVQIP (SEQ ID NO:12)

The murine sequence was identified using probes based on human CRF2-13 sequences. The isolation and characterization of the murine CRF2-13 sequence is disclosed in detail in the Examples, below.

A CRF2-12 nucleic acid, and the encoded polypeptide, according to the invention are useful in a variety of applications and contexts. For example, sequence comparison reveals that the disclosed CRF2-12 nucleic acids (Tables 1, 3, 5 and 7) encode secreted members of this family of receptors. One or more secreted receptor chains may be associated with, and/or modulate the activity of, another membrane bound member of CRF2, or a membrane bound receptor of another family. Alternatively, or in addition, the receptor chains disclosed herein may act alone or in combination with another soluble receptor. In effect, the receptor could also be a ligand.

It is also contemplated that the alternative forms polypeptides based on the polypeptide sequences shown in Tables 2, 4, and 6 may be expressed in different tissues and/or different conditions and thus carry out tissue specific affects.

A CRF2-12 polypeptide of the invention may additionally be used as a soluble receptor antagonist. Soluble receptor antagonists that block the activity of specific cytokines, *e.g.*, TNF, are known in the art. A CRF2-12 polypeptide of the invention can similarly block the activity of a cytokine that acts through a CRF2 member. Examples of such polypeptides include IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, AK155, mda-7 or an interferon, such as interferon alpha, interferon beta, or interferon gamma.

In one embodiment, a CRF2-12 polypeptide of the invention is used to antagonize the function of IL-22. IL-22 is distantly related in sequence to IL-10 and is produced by activated T cells. IL-22 signaling into a cell is mediated by its receptor chains, IL-22R and CRF2-4, both members of the CRF2 family. The CRF2-4 receptor was originally reported to serve as a second component in IL-10 signaling. IL-22 has been reported to inhibit IL-4 production from human Th2 T cells and to induce acute phase proteins in the liver of mice.

CRF2-12 nucleic acids and polypeptides according to the invention may additionally be used to identify cell types that make the invention or bind to the invention in a population of cells. The CRF2-12 nucleic acids and polypeptides can also be used for immunomodulation, inflammation, immunosuppression, allergy, asthma, autoimmunity (including rheumatoid arthritis and multiple sclerosis), repair of vascular smooth muscle cell after vascular injury or disease, transplantation and cancer based on the ligand that associates with this soluble receptor, alone or in conjunction with another receptor, and the impact that this ligand has on the above mechanisms and/or pathologies.

For example, a CRF2-12 polypeptide of the invention may exhibit one or more of the following activities: (1) modulation, *e.g.*, it may antagonize a signal transduction pathway mediated by a cytokine (such as IL-10 or IL-22); (2) modulation of cytokine production and/or secretion (*e.g.*, production and/or secretion of a proinflammatory cytokine); (3) modulation of lymphokine production and/or secretion; (4) modulation of expression or activity of nuclear transcription factors (5) competition with cytokine receptors for cytokine ligands; (6) modulation of cell proliferation, development or differentiation, *e.g.*, cytokine-stimulated (such as IL-10 or IL-22) production, development, or differentiation; (7) modulation of cellular immune responses; modulation of cytokine-meditated proinflammatory actions; and/or promotion and/or potentiation of immune reactions.

A CRF2-12 polypeptide of the invention may directly, by association with a membrane bound receptor, or indirectly, by its association with a soluble ligand affect or effect one or more of the following cell types: circulating or tissue-associated cells: T cells, B cells, NK cells, NK T cells, dendritic cells, macrophages, monocytes, neutrophils, mast cells, basophils, eosinophils, as well as cells in the respiratory tract, pancreas, kidney, liver, small and large intestine. A CRF2-12 polypeptide of the invention may additionally modulate upregulation of humoral immune responses and cell-mediated immune reactions; modulate the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines; and modulate inflammatory responses associated with injury, sepsis, gastrointestinal and cardiovascular disease, or inflammation following surgery.

For efficient production of the protein, it is preferable to place the CRF2-12 sequences under the control of expression control sequences optimized for expression in a desired host. For example, the sequences may include optimized transcriptional and/or translational regulatory sequences (such as altered Kozak sequences). In addition, the mature amino terminus of a CRF2-12 protein may be operably linked to a non-CRF2-12 signal sequence based on a hypothetical or empirically determined of the mature amino terminal end of the protein.

A CRF2-12 fusion protein can be used to identify and determine binding partners using assays known in the art. These assays include, *e.g.*, either histological, immunochemical, BIACORE or cell biology based assays.

Assays can also be performed in order to determine whether a CRF2-12 protein of the invention associates with cell types that already express other members of the CRF2 family. A CRF2-12 of the invention can also be examined for its ability to modulate the activity of known or novel cytokines (*e.g.*, by inhibiting or otherwise antagonizing the functions of a cytokine).

For example, several novel IL-10 like molecules have been cloned. IL-22 is one of these molecules. It has been reported that this molecule blocks the production of IL-4 by Th2 cells (human) and initiates an acute phase response (mice). A finding that CRF2-12 binds to and inhibits IL-22 (or other IL-10 like molecules) indicates a CRF2-12 invention can be used to treat or prevent diseases associated with high levels of the IL-22 polypeptide.

It is also anticipated that a CRF2-12 polypeptide of the invention associates with other receptors and/or their associated cytokines within the CRF2 family. For example, a CRF2-12 of the invention may associate with either chain of the IL-22R and affect the function of the receptor or the IL-22 ligand.

CRF2-1 Nucleic Acids

The nucleic acids of the invention include those that encode a CRF2-12 polypeptide or protein. As used herein, the terms polypeptide and protein are interchangeable.

In some embodiments, a CRF2-12 nucleic acid encodes a mature CRF2-12 polypeptide. As used herein, a "mature" form of a polypeptide or protein described herein relates to the product of a naturally occurring polypeptide or precursor form or proprotein. The naturally occurring polypeptide, precursor or proprotein includes, by way of nonlimiting example, the full length gene product, encoded by the corresponding gene. Alternatively, it may be defined as the polypeptide, precursor or proprotein encoded by an open reading frame described herein. The product "mature" form arises, again by way of nonlimiting example, as a result of one or more naturally occurring processing steps that may take place within the cell in which the gene product arises. Examples of such processing steps leading to a "mature" form of a polypeptide or protein include the

cleavage of the N-terminal methionine residue encoded by the initiation codon of an open reading frame, or the proteolytic cleavage of a signal peptide or leader sequence. Thus a mature form arising from a precursor polypeptide or protein that has residues 1 to N, where residue 1 is the N-terminal methionine, would have residues 2 through N remaining after removal of the N-terminal methionine. Alternatively, a mature form arising from a precursor polypeptide or protein having residues 1 to N, in which an N-terminal signal sequence from residue 1 to residue M is cleaved, would have the residues from residue M+1 to residue N remaining. Further as used herein, a "mature" form of a polypeptide or protein may arise from a step of post-translational modification other than a proteolytic cleavage event. Such additional processes include, by way of non-limiting example, glycosylation, myristoylation or phosphorylation. In general, a mature polypeptide or protein may result from the operation of only one of these processes, or a combination of any of them.

Among the CRF2-12 nucleic acids is the nucleic acid whose sequence is provided in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11 or a fragment thereof. Additionally, the invention includes mutant or variant nucleic acids of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, or a fragment thereof, any of whose bases may be changed from the corresponding bases, while still encoding a protein that maintains at least one of its CRF2-12 -like activities and physiological functions (*e.g.*, binding cytokines). The invention further includes the complement of the nucleic acid sequence of the disclosed CRF2-12 nucleic acids, including fragments, derivatives, analogs and homologs thereof. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications.

The invention also includes nucleic acids that encode a CRF2-12 polypeptide having one or more of the polypeptide sequences MMPKHCL/FLG L/FLI, (SEQ ID NO:13), FQSRNFHNILH/QWQ A/PG (SEQ ID NO:14), SI/VYFVQYKM/IYGQS/RQW (SEQ ID NO:15), TPRFTPWWETKL/IDPPV (SEQ ID NO:16), LV/LYRVFT/IINNSLEKEQKA/VYEG (SEQ ID NO:17), RAVEIEG/ALI/TPHSSYCVVAEM/IYQPM (SEQ ID NO:18), and DRRSP/QRSK/EERCVQ/EIP (SEQ ID NO:19).

One aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid molecules that encode CRF2-12 proteins or biologically active portions thereof. Also included are nucleic acid

fragments sufficient for use as hybridization probes to identify CRF2-12 -encoding nucleic acids (*e.g.*, CRF2-12 mRNA) and fragments for use as polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification or mutation of CRF2-12 nucleic acid molecules. As used herein, the term "nucleic acid molecule" is intended to include DNA molecules (*e.g.*, cDNA or genomic DNA), RNA molecules (*e.g.*, mRNA), analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs, and derivatives, fragments and homologs thereof. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

"Probes" refer to nucleic acid sequences of variable length, preferably between at least about 10 nucleotides (nt), 100 nt, or as many as about, *e.g.*, 6,000 nt, depending on use. Probes are used in the detection of identical, similar, or complementary nucleic acid sequences. Longer length probes are usually obtained from a natural or recombinant source, are highly specific and much slower to hybridize than oligomers. Probes may be single- or double-stranded and designed to have specificity in PCR, membrane-based hybridization technologies, or ELISA-like technologies.

An "isolated" nucleic acid molecule is one that is separated from other nucleic acid molecules that are present in the natural source of the nucleic acid. Examples of isolated nucleic acid molecules include, but are not limited to, recombinant DNA molecules contained in a vector, recombinant DNA molecules maintained in a heterologous host cell, partially or substantially purified nucleic acid molecules, and synthetic DNA or RNA molecules. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (*i.e.*, sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated CRF2-12 nucleic acid molecule can contain less than about 50 kb, 25 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material or culture medium when produced by recombinant techniques, or of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

A nucleic acid molecule of the present invention, *e.g.*, a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, or a complement thereof, can be isolated using standard molecular biology

techniques and the sequence information provided herein. Using all or a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 as a hybridization probe, CRF2-12 nucleic acid sequences can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (*e.g.*, as described in Sambrook *et al.*, eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; and Ausubel, *et al.*, eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993.)

A nucleic acid of the invention can be amplified using cDNA, mRNA or alternatively, genomic DNA, as a template and appropriate oligonucleotide primers according to standard PCR amplification techniques. The nucleic acid so amplified can be cloned into an appropriate vector and characterized by DNA sequence analysis. Furthermore, oligonucleotides corresponding to CRF2-12 nucleotide sequences can be prepared by standard synthetic techniques, *e.g.*, using an automated DNA synthesizer.

As used herein, the term "oligonucleotide" refers to a series of linked nucleotide residues, which oligonucleotide has a sufficient number of nucleotide bases to be used in a PCR reaction. A short oligonucleotide sequence may be based on, or designed from, a genomic or cDNA sequence and is used to amplify, confirm, or reveal the presence of an identical, similar or complementary DNA or RNA in a particular cell or tissue. Oligonucleotides comprise portions of a nucleic acid sequence having about 10 nt, 50 nt, or 100 nt in length, preferably about 15 nt to 30 nt in length. In one embodiment, an oligonucleotide comprising a nucleic acid molecule less than 100 nt in length would further comprise at lease 6 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11, or a complement thereof. Oligonucleotides may be chemically synthesized and may be used as probes.

In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention comprises a nucleic acid molecule that is a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11, or a portion of this nucleotide sequence. A nucleic acid molecule that is complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 is one that is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 that it can hydrogen bond with little or no mismatches to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, thereby forming a stable duplex.

As used herein, the term "complementary" refers to Watson-Crick or Hoogsteen base pairing between nucleotide units of a nucleic acid molecule, and the term "binding" means the physical or chemical interaction between two polypeptides or compounds or associated polypeptides or compounds or combinations thereof. Binding includes ionic, non-ionic, Von der Waals, hydrophobic interactions, etc. A physical interaction can be either direct or indirect. Indirect interactions may be through or due to the effects of another polypeptide or compound. Direct binding refers to interactions that do not take place through, or due to, the effect of another polypeptide or compound, but instead are without other substantial chemical intermediates.

Moreover, the nucleic acid molecule of the invention can comprise only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, or SEQ ID NO:11, *e.g.*, a fragment that can be used as a probe or primer, or a fragment encoding a biologically active portion of CRF2-12 . Fragments provided herein are defined as sequences of at least 6 (contiguous) nucleic acids or at least 4 (contiguous) amino acids, a length sufficient to allow for specific hybridization in the case of nucleic acids or for specific recognition of an epitope in the case of amino acids, respectively, and are at most some portion less than a full length sequence. Fragments may be derived from any contiguous portion of a nucleic acid or amino acid sequence of choice. Derivatives are nucleic acid sequences or amino acid sequences formed from the native compounds either directly or by modification or partial substitution. Analogs are nucleic acid sequences or amino acid sequences that have a structure similar to, but not identical to, the native compound but differs from it in respect to certain components or side chains. Analogs may be synthetic or from a different evolutionary origin and may have a similar or opposite metabolic activity compared to wild type.

Derivatives and analogs may be full length or other than full length, if the derivative or analog contains a modified nucleic acid or amino acid, as described below. Derivatives or analogs of the nucleic acids or proteins of the invention include, but are not limited to, molecules comprising regions that are substantially homologous to the nucleic acids or proteins of the invention, in various embodiments, by at least about 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or even 99% identity (with a preferred identity of 80-99%) over a nucleic acid or amino acid sequence of identical size or when compared to an aligned sequence in which the alignment is done by a computer homology program known in the art, or whose encoding nucleic acid is capable of hybridizing to the complement of a

sequence encoding the aforementioned proteins under stringent, moderately stringent, or low stringent conditions. See *e.g.* Ausubel, *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993, and below. An exemplary program is the Gap program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI) using the default settings, which uses the algorithm of Smith and Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482-489, which is incorporated herein by reference in its entirety).

A "homologous nucleic acid sequence" or "homologous amino acid sequence," or variations thereof, refer to sequences characterized by a homology at the nucleotide level or amino acid level as discussed above. Homologous nucleotide sequences encode those sequences coding for isoforms of a CRF2-12 polypeptide. Isoforms can be expressed in different tissues of the same organism as a result of, for example, alternative splicing of RNA. Alternatively, isoforms can be encoded by different genes. In the present invention, homologous nucleotide sequences include nucleotide sequences encoding for a CRF2-12 polypeptide of species other than humans, including, but not limited to, mammals, and thus can include, *e.g.*, mouse, rat, rabbit, dog, cat cow, horse, and other organisms. Homologous nucleotide sequences also include, but are not limited to, naturally occurring allelic variations and mutations of the nucleotide sequences set forth herein. A homologous nucleotide sequence does not, however, include the nucleotide sequence encoding human CRF2-12 protein. Homologous nucleic acid sequences include those nucleic acid sequences that encode conservative amino acid substitutions (see below) in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12, as well as a polypeptide having CRF2-12 activity. For example, a CRF2-12 nucleic acid of the invention includes a nucleic acid that encodes a polypeptide having one or more, e.g., two, three, five, ten, 15, 20, or 25 or more substitutions in its amino acid sequence relative to amino acids 21-62 of SEQ ID NO:2.

Biological activities of the CRF2-12 proteins are described below. A homologous amino acid sequence does not encode the amino acid sequence of a human CRF2-12 polypeptide.

The nucleotide sequence determined from the cloning of the human CRF2-12 gene allows for the generation of probes and primers designed for use in identifying and/or cloning CRF2-12 homologues in other cell types, *e.g.*, from other tissues, as well as CRF2-12 homologues from other mammals. The probe/primer typically comprises a

substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 or 400 or more consecutive sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11; or an anti-sense strand nucleotide sequence of one of these sequences; or of a naturally occurring mutant of one of these.

Probes based on the human CRF2-12 nucleotide sequence can be used to detect transcripts or genomic sequences encoding the same or homologous proteins. In various embodiments, the probe further comprises a label group attached thereto, *e.g.*, the label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissue which misexpress a CRF2-12 protein, such as by measuring a level of a CRF2-12 -encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject *e.g.*, detecting CRF2-12 mRNA levels or determining whether a genomic CRF2-12 gene has been mutated or deleted.

A "polypeptide having a biologically active portion of CRF2-12 " refers to polypeptides exhibiting activity similar, but not necessarily identical to, an activity of a polypeptide of the present invention, including mature forms, as measured in a particular biological assay, with or without dose dependency. A nucleic acid fragment encoding a "biologically active portion of CRF2-12 " can be prepared by isolating a portion of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, that encodes a polypeptide having a CRF2-12 biological activity (biological activities of the CRF2-12 proteins are described below), expressing the encoded portion of CRF2-12 protein (*e.g.*, by recombinant expression *in vitro*) and assessing the activity of the encoded portion of CRF2-12 . For example, a nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of CRF2-12 can optionally include an ATP-binding domain. In another embodiment, a nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of CRF2-12 includes one or more regions.

CRF2-12 Variants

The invention further encompasses nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 due to the degeneracy of the genetic code. These nucleic acids thus encode the same CRF2-12 protein as that encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID

NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, *e.g.*, the polypeptide of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12, respectively. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention has a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12, respectively.

In addition to the human CRF2-12 nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, or SEQ ID NO:11, it will be appreciated by those skilled in the art that DNA sequence polymorphisms that lead to changes in the amino acid sequences of CRF2-12 may exist within a population (*e.g.*, the human population). Such genetic polymorphism in the CRF2-12 gene may exist among individuals within a population due to natural allelic variation. As used herein, the terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules comprising an open reading frame encoding a CRF2-12 protein, preferably a mammalian CRF2-12 protein. Such natural allelic variations can typically result in 1-5% variance in the nucleotide sequence of the CRF2-12 gene. Any and all such nucleotide variations and resulting amino acid polymorphisms in CRF2-12 that are the result of natural allelic variation and that do not alter the functional activity of CRF2-12 are intended to be within the scope of the invention.

Moreover, nucleic acid molecules encoding CRF2-12 proteins from other species, and thus that have a nucleotide sequence that differs from the human sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:5, or the murine sequence of SEQ ID NO:11, are intended to be within the scope of the invention. Nucleic acid molecules corresponding to natural allelic variants and homologues of the CRF2-12 cDNAs of the invention can be isolated based on their homology to the human CRF2-12 nucleic acids disclosed herein using the human cDNAs, or a portion thereof, as a hybridization probe according to standard hybridization techniques under stringent hybridization conditions. For example, a soluble human or murine CRF2-12 cDNA can be isolated based on its homology to human membrane-bound CRF2-12 . Likewise, a membrane-bound human or murine CRF2-12 cDNA can be isolated based on its homology to soluble human CRF2-12 .

Accordingly, in another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention is at least 6 nucleotides in length and hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11. In another embodiment, the nucleic acid is at

least 10, 25, 50, 100, 250, 500 or 750 nucleotides in length. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention hybridizes to the coding region. As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" is intended to describe conditions for hybridization and washing under which nucleotide sequences at least 60% homologous to each other typically remain hybridized to each other.

Homologs (*i.e.,* nucleic acids encoding CRF2-12 proteins derived from species other than human) or other related sequences (*e.g.,* paralogs) can be obtained by low, moderate or high stringency hybridization with all or a portion of the particular human sequence as a probe using methods well known in the art for nucleic acid hybridization and cloning.

As used herein, the phrase "stringent hybridization conditions" refers to conditions under which a probe, primer or oligonucleotide will hybridize to its target sequence, but to no other sequences. Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. Longer sequences hybridize specifically at higher temperatures than shorter sequences. Generally, stringent conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The Tm is the temperature (under defined ionic strength, pH and nucleic acid concentration) at which 50% of the probes complementary to the target sequence hybridize to the target sequence at equilibrium. Since the target sequences are generally present at excess, at Tm, 50% of the probes are occupied at equilibrium. Typically, stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.0 M sodium ion, typically about 0.01 to 1.0 M sodium ion (or other salts) at pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30°C for short probes, primers or oligonucleotides (*e.g.,* 10 nt to 50 nt) and at least about 60°C for longer probes, primers and oligonucleotides. Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents, such as formamide.

Stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Preferably, the conditions are such that sequences at least about 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99% homologous to each other typically remain hybridized to each other. A non-limiting example of stringent hybridization conditions is hybridization in a high salt buffer comprising 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, and 500 mg/ml denatured salmon sperm

DNA at 65°C. This hybridization is followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.01% BSA at 50°C. An isolated nucleic acid molecule of the invention that hybridizes under stringent conditions to the sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, corresponds to a naturally occurring nucleic acid molecule. As used herein, a "naturally-occurring" nucleic acid molecule refers to an RNA or DNA molecule having a nucleotide sequence that occurs in nature (*e.g.*, encodes a natural protein).

In a second embodiment, a nucleic acid sequence that is hybridizable to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, or fragments, analogs or derivatives thereof, under conditions of moderate stringency is provided. A non-limiting example of moderate stringency hybridization conditions are hybridization in 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS and 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA at 55°C, followed by one or more washes in 1X SSC, 0.1% SDS at 37°C. Other conditions of moderate stringency that may be used are well known in the art. See, *e.g.*, Ausubel *et al.* (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, and Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

In a third embodiment, a nucleic acid that is hybridizable to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, or fragments, analogs or derivatives thereof, under conditions of low stringency, is provided. A non-limiting example of low stringency hybridization conditions are hybridization in 35% formamide, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA, 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA, 10% (wt/vol) dextran sulfate at 40°C, followed by one or more washes in 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, and 0.1% SDS at 50°C. Other conditions of low stringency that may be used are well known in the art (*e.g.*, as employed for cross-species hybridizations). See, *e.g.*, Ausubel *et al.* (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, and Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; Shilo and Weinberg, 1981, *Proc Natl Acad Sci USA 78*: 6789-6792.

Conservative mutations

In addition to naturally-occurring allelic variants of the CRF2-12 sequence that may exist in the population, the skilled artisan will further appreciate that changes can be

introduced by mutation into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, thereby leading to changes in the amino acid sequence of the encoded CRF2-12 protein, without altering the functional ability of the CRF2-12 protein. For example, nucleotide substitutions leading to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues can be made in the sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of CRF2-12 without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the CRF2-12 proteins of the present invention, are predicted to be particularly unamenable to alteration.

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules encoding CRF2-12 proteins that contain changes in amino acid residues that are not essential for activity. Such CRF2-12 proteins differ in amino acid sequence from SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:12, yet retain biological activity. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence encoding a protein, wherein the protein comprises an amino acid sequence at least about 75% homologous to one of these amino acid sequences. Preferably, the protein encoded by the nucleic acid is at least about 80% homologous to one of these amino acid sequences, more preferably at least about 90%, 95%, 98%, and most preferably at least about 99% homologous to one of these amino acid sequences.

An isolated nucleic acid molecule encoding a CRF2-12 protein homologous to the protein of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12 can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein.

Mutations can be introduced into the a CRF2-12 nucleotide sequence (e.g., SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11) by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include

amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in CRF2-12 is replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of a CRF2-12 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for CRF2-12 biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 the encoded protein can be expressed by any recombinant technology known in the art and the activity of the protein can be determined.

In one embodiment, a mutant CRF2-12 protein can be assayed for (1) the ability to form protein:protein interactions with other CRF2-12 proteins, other cell-surface proteins, or biologically active portions thereof, (2) complex formation between a mutant CRF2-12 protein and a CRF2-12 receptor; (3) the ability of a mutant CRF2-12 protein to bind to an intracellular target protein or biologically active portion thereof; (*e.g.*, avidin proteins); (4) the ability to bind CRF2-12 protein; (5) the ability to specifically bind an anti-CRF2-12 protein antibody, or (6) the ability to bind to a cytokine polypeptide such as IL-22.

Antisense CRF2-12 Nucleic Acids

Another aspect of the invention pertains to isolated antisense nucleic acid molecules that are hybridizable to or complementary to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11, or fragments, analogs or derivatives thereof. An "antisense" nucleic acid comprises a nucleotide sequence that is complementary to a "sense" nucleic acid encoding a protein, *e.g.*, complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence. In specific aspects, antisense nucleic acid molecules are provided that comprise a sequence complementary to at least about 10, 25, 50, 100, 250 or 500 nucleotides or an entire CRF2-12 coding strand, or to only a portion thereof. Nucleic acid molecules encoding fragments, homologs, derivatives and analogs of a CRF2-12 protein of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6, or antisense

nucleic acids complementary to a CRF2-12 nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 are additionally provided.

In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a "coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding CRF2-12 . The term "coding region" refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid residues (*e.g.*, the protein coding region of human CRF2-12 corresponds to SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12). In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding CRF2-12 . The term "noncoding region" refers to 5' and 3' sequences which flank the coding region that are not translated into amino acids (*i.e.*, also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Given the coding strand sequences encoding CRF2-12 disclosed herein (*e.g.*, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11), antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick or Hoogsteen base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of CRF2-12 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide that is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of CRF2-12 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of CRF2-12 mRNA. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis or enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (*e.g.*, an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between the antisense and sense nucleic acids, *e.g.*, phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used.

Examples of modified nucleotides that can be used to generate the antisense nucleic acid include: 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxylmethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine,

2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (*i.e.*, RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

The antisense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject or generated *in situ* such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a CRF2-12 protein to thereby inhibit expression of the protein, *e.g.*, by inhibiting transcription and/or translation. The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an antisense nucleic acid molecule that binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An example of a route of administration of antisense nucleic acid molecules of the invention includes direct injection at a tissue site. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For example, for systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, *e.g.*, by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies that bind to cell surface receptors or antigens. The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient intracellular concentrations of antisense molecules, vector constructs in which the antisense nucleic acid molecule is placed under the control of a strong pol II or pol III promoter are preferred.

In yet another embodiment, the antisense nucleic acid molecule of the invention is an α-anomeric nucleic acid molecule. An α-anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual β-units, the strands run parallel to each other (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res* 15:

6625-6641). The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide (Inoue *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res* 15: 6131-6148) or a chimeric RNA -DNA analogue (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett* 215: 327-330).

Such modifications include, by way of nonlimiting example, modified bases, and nucleic acids whose sugar phosphate backbones are modified or derivatized. These modifications are carried out at least in part to enhance the chemical stability of the modified nucleic acid, such that they may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject.

CRF2-12 Ribozymes and PNA moieties

In still another embodiment, an antisense nucleic acid of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity that are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as a mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (*e.g.*, hammerhead ribozymes (described in Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) can be used to catalytically cleave CRF2-12 mRNA transcripts to thereby inhibit translation of CRF2-12 mRNA. A ribozyme having specificity for a CRF2-12 -encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a CRF2-12 DNA disclosed herein (*i.e.*, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11). For example, a derivative of a Tetrahymena L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a CRF2-12 -encoding mRNA. See, *e.g.*, Cech *et al.* U.S. Pat. No. 4,987,071; and Cech *et al.* U.S. Pat. No. 5,116,742. Alternatively, CRF2-12 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, *e.g.*, Bartel *et al.*, (1993) *Science* 261:1411-1418.

Alternatively, CRF2-12 gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the CRF2-12 (*e.g.*, the CRF2-12 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the CRF2-12 gene in target cells. See generally, Helene. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6: 569-84; Helene. *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; and Maher (1992) *Bioassays* 14: 807-15.

In various embodiments, the nucleic acids of CRF2-12 can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, *e.g.*, the stability, hybridization,

or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acids can be modified to generate peptide nucleic acids (see Hyrup *et al.* (1996) *Bioorg Med Chem* 4: 5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics, *e.g.*, DNA mimics, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs has been shown to allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup *et al.* (1996) above; Perry-O'Keefe *et al.* (1996) *PNAS* 93: 14670-675.

PNAs of CRF2-12 can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, *e.g.*, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of CRF2-12 can also be used, *e.g.*, in the analysis of single base pair mutations in a gene by, *e.g.*, PNA directed PCR clamping; as artificial restriction enzymes when used in combination with other enzymes, *e.g.*, S1 nucleases (Hyrup B. (1996) above); or as probes or primers for DNA sequence and hybridization (Hyrup *et al.* (1996), above; Perry-O'Keefe (1996), above).

In another embodiment, PNAs of CRF2-12 can be modified, *e.g.*, to enhance their stability or cellular uptake, by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. For example, PNA-DNA chimeras of CRF2-12 can be generated that may combine the advantageous properties of PNA and DNA. Such chimeras allow DNA recognition enzymes, *e.g.*, RNase H and DNA polymerases, to interact with the DNA portion while the PNA portion would provide high binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (Hyrup (1996) above). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup (1996) above and Finn *et al.* (1996) *Nucl Acids Res* 24: 3357-63. For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry, and modified nucleoside analogs, *e.g.*, 5'-(4-methoxytrityl) amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used between the PNA and the 5' end of DNA (Mag *et al.* (1989) *Nucl Acid Res* 17: 5973-88). PNA

monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment (Finn *et al.* (1996) above). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment. See, Petersen *et al.* (1975) *Bioorg Med Chem Lett* 5: 1119-11124.

In other embodiments, the oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, *e.g.*, Letsinger *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6553-6556; Lemaitre *et al.*, 1987, Proc. *Natl. Acad. Sci.* 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810) or the blood-brain barrier (see, *e.g.*, PCT Publication No. W089/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization triggered cleavage agents (See, *e.g.*, Krol *et al.*, 1988, *BioTechniques* 6:958-976) or intercalating agents. (See, *e.g.*, Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5: 539-549). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, *e.g.*, a peptide, a hybridization triggered cross-linking agent, a transport agent, a hybridization-triggered cleavage agent, etc.

CRF2-12 Polypeptides

A CRF2-12 polypeptide of the invention includes the CRF2-12 -like protein whose sequence is provided in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12. The invention also CRF2-12 polypeptide encoded by the CRF2-12 nucleic acids disclosed herein. For example, a CRF2-12 polypeptide includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in these polypeptide sequences while still encoding a protein that maintains its CRF2-12 -like activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In some embodiments, up to 20% or more of the residues may be so changed in the mutant or variant protein. In some embodiments, the CRF2-12 polypeptide according to the invention is a mature polypeptide.

In general, a CRF2-12 -like variant that preserves CRF2-12 -like function includes any variant in which residues at a particular position in the sequence have been substituted by other amino acids, and further include the possibility of inserting an additional residue or residues between two residues of the parent protein as well as the possibility of deleting one or more residues from the parent sequence. Any amino acid substitution, insertion, or deletion is encompassed by the invention. In favorable circumstances, the substitution is a conservative substitution as defined above.

One aspect of the invention pertains to isolated CRF2-12 proteins, and biologically active portions thereof, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Also provided are polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-CRF2-12 antibodies. In one embodiment, native CRF2-12 proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, CRF2-12 proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a CRF2-12 protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

An "isolated" or "purified" protein or biologically active portion thereof is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the CRF2-12 protein is derived, or substantially free from chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of CRF2-12 protein in which the protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. In one embodiment, the language "substantially free of cellular material" includes preparations of CRF2-12 protein having less than about 30% (by dry weight) of non-CRF2-12 protein (also referred to herein as a "contaminating protein"), more preferably less than about 20% of non-CRF2-12 protein, still more preferably less than about 10% of non-CRF2-12 protein, and most preferably less than about 5% non-CRF2-12 protein. When the CRF2-12 protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, *i.e.*, culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the protein preparation.

The language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of CRF2-12 protein in which the protein is separated from chemical precursors or other chemicals that are involved in the synthesis of the protein. In one embodiment, the language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of CRF2-12 protein having less than about 30% (by dry weight) of chemical precursors or non-CRF2-12 chemicals, more preferably less than about 20% chemical precursors or non-CRF2-12 chemicals, still more preferably less than about 10% chemical precursors or non-CRF2-12 chemicals, and most preferably less than about 5% chemical precursors or non-CRF2-12 chemicals.

Biologically active portions of a CRF2-12 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from the amino acid sequence of the CRF2-12 protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12, that include fewer amino acids than the full length CRF2-12 proteins, and exhibit at least one activity of a CRF2-12 protein (e.g., binding a cytokine such as IL-10 or IL-22). Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the CRF2-12 protein. A biologically active portion of a CRF2-12 protein can be a polypeptide which is, for example, 10, 25, 50, 100 or more amino acids in length.

A biologically active portion of a CRF2-12 protein of the present invention may contain at least one of the above-identified domains conserved between the CRF2-12 proteins. Moreover, other biologically active portions, in which other regions of the protein are deleted, can be prepared by recombinant techniques and evaluated for one or more of the functional activities of a native CRF2-12 protein.

In an embodiment, the CRF2-12 protein has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12. In other embodiments, the CRF2-12 protein is substantially homologous to SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12 and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis, as described in detail below. Accordingly, in another embodiment, the CRF2-12 protein is a protein that comprises an amino acid sequence at least about 45% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:12 and retains the functional activity of the CRF2-12 proteins of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:12.

A CRF2-12 polypeptide of the invention also includes a polypeptide having one or more, e.g., two, three, five, ten, 15, 20, or 25 or more substitutions in its amino acid sequence relative to amino acids 21-62 of SEQ ID NO:2.

Determining homology between two or more sequence

To determine the percent homology of two amino acid sequences or of two nucleic acids, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (*e.g.*, gaps can be introduced in either of the sequences being compared for optimal alignment between the

sequences). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are homologous at that position (*i.e.*, as used herein amino acid or nucleic acid "homology" is equivalent to amino acid or nucleic acid "identity").

The nucleic acid sequence homology may be determined as the degree of identity between two sequences. The homology may be determined using computer programs known in the art, such as GAP software provided in the GCG program package. See, *Needleman and Wunsch* 1970 *J Mol Biol* 48: 443-453. Using GCG GAP software with the following settings for nucleic acid sequence comparison: GAP creation penalty of 5.0 and GAP extension penalty of 0.3, the coding region of the analogous nucleic acid sequences referred to above exhibits a degree of identity preferably of at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99%, with the CDS (encoding) part of the DNA sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11.

The term "sequence identity" refers to the degree to which two polynucleotide or polypeptide sequences are identical on a residue-by-residue basis over a particular region of comparison. The term "percentage of sequence identity" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over that region of comparison, determining the number of positions at which the identical nucleic acid base (*e.g.*, A, T, C, G, U, or I, in the case of nucleic acids) occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the region of comparison (*i.e.*, the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. The term "substantial identity" as used herein denotes a characteristic of a polynucleotide sequence, wherein the polynucleotide comprises a sequence that has at least 80 percent sequence identity, preferably at least 85 percent identity and often 90 to 95 percent sequence identity, more usually at least 99 percent sequence identity as compared to a reference sequence over a comparison region. The term "percentage of positive residues" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over that region of comparison, determining the number of positions at which the identical and conservative amino acid substitutions, as defined above, occur in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched

positions by the total number of positions in the region of comparison (*i.e.*, the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of positive residues.

Chimeric and fusion proteins

The invention also provides CRF2-12 chimeric or fusion proteins. As used herein, a CRF2-12 "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a CRF2-12 polypeptide operatively linked to a non-CRF2-12 polypeptide. An "CRF2-12 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to CRF2-12 , whereas a "non-CRF2-12 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein that is not substantially homologous to the CRF2-12 protein, *e.g.*, a protein that is different from the CRF2-12 protein and that is derived from the same or a different organism. Within a CRF2-12 fusion protein the CRF2-12 polypeptide can correspond to all or a portion of a CRF2-12 protein. In one embodiment, a CRF2-12 fusion protein comprises at least one biologically active portion of a CRF2-12 protein. In another embodiment, a CRF2-12 fusion protein comprises at least two biologically active portions of a CRF2-12 protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the CRF2-12 polypeptide and the non-CRF2-12 polypeptide are fused in-frame to each other. The non-CRF2-12 polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the CRF2-12 polypeptide.

For example, in one embodiment a CRF2-12 fusion protein comprises a CRF2-12 polypeptide operably linked to either an extracellular domain of a second protein, *i.e.*, non-CRF2-12 protein, or to the transmembrane and intracellular domain of a second protein, *i.e.*, non-CRF2-12 protein. Such fusion proteins can be further utilized in screening assays for compounds that modulate CRF2-12 activity (such assays are described in detail below).

In another embodiment, the fusion protein is a GST-CRF2-12 fusion protein in which the CRF2-12 sequences are fused to the C-terminus of the GST (i.e., glutathione S-transferase) sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant CRF2-12 .

In another embodiment, the fusion protein is a CRF2-12 -immunoglobulin fusion protein in which the CRF2-12 sequences comprising one or more domains are fused to sequences derived from a member of the immunoglobulin protein family.

The CFR2-12 fusion proteins (*e.g.*, CRF2-12 -immunoglobulin fusion proteins) of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject to inhibit or augment an interaction between a cell surface receptor and its ligand. This could occur either by 1) binding to and removing available ligand for the receptor (Fc mediated scavenging of the ligand affecting bioavailability); 2) binding to the ligand and blocking its ability to bind to the cell receptor (antagonizing or neutralizing); 3) associating with another CRF member and thereby modulating (*e.g.*, inhibiting) a downstream signal transduction cascade; 4) associating with either a ligand or another CRF and facilitating the activity of the ligand. By all of these mechanisms, a CRF2-12 protein may be used to modulate the interaction between a CRF2 receptor and its cognate ligand (*e.g.*, an interaction between IL-10 and an IL-10 receptor and interaction between IL-22 and an IL-22 receptor).

Inhibition of the CRF2-12 ligand/CRF2-12 interaction can be used therapeutically for both the treatment of proliferative and differentiative disorders, *e,g.*, cancer, modulating (*e.g.*, promoting or inhibiting) cell survival as well as immunomodulatory disorders, autoimmunity, transplantation, and inflammation by alteration of cyotokine and chemokine cascade mechanisms. Moreover, the CRF2-12 -immunoglobulin fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-CRF2-12 antibodies in a subject, to purify CRF2-12 ligands, and in screening assays to identify molecules that inhibit the interaction of CRF2-12 with a CRF2-12 ligand.

A CRF2-12 chimeric or fusion protein of the invention can be produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, *e.g.*, by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, for example, Ausubel et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that already

encode a fusion moiety (*e.g.*, a GST polypeptide). A CRF2-12 -encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the CRF2-12 protein.

Polypeptide libraries

In addition, libraries of fragments of the CRF2-12 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of CRF2-12 fragments for screening and subsequent selection of variants of a CRF2-12 protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a CRF2-12 coding sequence with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double stranded DNA, renaturing the DNA to form double stranded DNA that can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, an expression library can be derived which encodes N-terminal and internal fragments of various sizes of the CRF2-12 protein.

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of CRF2-12 proteins. The most widely used techniques, which are amenable to high throughput analysis, for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique that enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify CRF2-12 variants (Arkin and Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) Protein Engineering 6:327-331).

CRF2-12 Antibodies

Also included in the invention are antibodies to CRF2-12 proteins, or fragments of CRF2-12 proteins. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin (Ig) molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site that specifically binds (immunoreacts with) an antigen. Such antibodies include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, F_{ab}, $F_{ab'}$ and $F_{(ab')2}$ fragments, and an F_{ab} expression library. In general, an antibody molecule obtained from humans relates to any of the classes IgG, IgM, IgA, IgE and IgD, which differ from one another by the nature of the heavy chain present in the molecule. Certain classes have subclasses as well, such as IgG_1, IgG_2, and others. Furthermore, in humans, the light chain may be a kappa chain or a lambda chain. Reference herein to antibodies includes a reference to all such classes, subclasses and types of human antibody species.

An isolated CRF2-12 -related protein of the invention may be intended to serve as an antigen, or a portion or fragment thereof, and additionally can be used as an immunogen to generate antibodies that immunospecifically bind the antigen, using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. The full-length protein can be used or, alternatively, the invention provides antigenic peptide fragments of the antigen for use as immunogens. An antigenic peptide fragment comprises at least 6

amino acid residues of the amino acid sequence of the full length protein, such as an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, or SEQ ID NO:12, and encompasses an epitope thereof such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the full length protein or with any fragment that contains the epitope. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, or at least 15 amino acid residues, or at least 20 amino acid residues, or at least 30 amino acid residues. Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of the protein that are located on its surface; commonly these are hydrophilic regions.

In certain embodiments of the invention, at least one epitope encompassed by the antigenic peptide is a region of CRF2-12 -related protein that is located on the surface of the protein, *e.g.*, a hydrophilic region. A hydrophobicity analysis of the human CRF2-12 -related protein sequence will indicate which regions of a CRF2-12 -related protein are particularly hydrophilic and, therefore, are likely to encode surface residues useful for targeting antibody production. As a means for targeting antibody production, hydropathy plots showing regions of hydrophilicity and hydrophobicity may be generated by any method well known in the art, including, for example, the Kyte Doolittle or the Hopp Woods methods, either with or without Fourier transformation. See, *e.g.*, Hopp and Woods, 1981, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78: 3824-3828; Kyte and Doolittle 1982, *J. Mol. Biol.* 157: 105-142, each of which is incorporated herein by reference in its entirety. Antibodies that are specific for one or more domains within an antigenic protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, are also provided herein.

A protein of the invention, or a derivative, fragment, analog, homolog or ortholog thereof, may be utilized as an immunogen in the generation of antibodies that immunospecifically bind these protein components.

Various procedures known within the art may be used for the production of polyclonal or monoclonal antibodies directed against a protein of the invention, or against derivatives, fragments, analogs homologs or orthologs thereof (see, for example, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporated herein by reference). Some of these antibodies are discussed below.

Polyclonal Antibodies

For the production of polyclonal antibodies, various suitable host animals (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal) may be immunized by one or more injections with the native protein, a synthetic variant thereof, or a derivative of the foregoing. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, the naturally occurring immunogenic protein, a chemically synthesized polypeptide representing the immunogenic protein, or a recombinantly expressed immunogenic protein. Furthermore, the protein may be conjugated to a second protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. The preparation can further include an adjuvant. Various adjuvants used to increase the immunological response include, but are not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), surface active substances (e.g., lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, dinitrophenol, etc.), adjuvants usable in humans such as Bacille Calmette-Guerin and Corynebacterium parvum, or similar immunostimulatory agents. Additional examples of adjuvants which can be employed include MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate).

The polyclonal antibody molecules directed against the immunogenic protein can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as affinity chromatography using protein A or protein G, which provide primarily the IgG fraction of immune serum. Subsequently, or alternatively, the specific antigen which is the target of the immunoglobulin sought, or an epitope thereof, may be immobilized on a column to purify the immune specific antibody by immunoaffinity chromatography. Purification of immunoglobulins is discussed, for example, by D. Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

Monoclonal Antibodies

The term "monoclonal antibody" (MAb) or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one molecular species of antibody molecule consisting of a unique light chain gene product and a unique heavy chain gene product. In particular, the complementarity determining regions (CDRs) of the monoclonal antibody are identical in all the molecules of the population. MAbs thus contain an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of the antigen characterized by a unique binding affinity for it.

Monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes can be immunized in vitro.

The immunizing agent will typically include the protein antigen, a fragment thereof or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells can be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine

myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an in vitro binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Preferably, antibodies having a high degree of specificity and a high binding affinity for the target antigen are isolated.

After the desired hybridoma cells are identified, the clones can be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in vivo as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones can be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

The monoclonal antibodies can also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA can be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the

recombinant host cells. The DNA also can be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

Humanized Antibodies

The antibodies directed against the protein antigens of the invention can further comprise humanized antibodies or human antibodies. These antibodies are suitable for administration to humans without engendering an immune response by the human against the administered immunoglobulin. Humanized forms of antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ or other antigen-binding subsequences of antibodies) that are principally comprised of the sequence of a human immunoglobulin, and contain minimal sequence derived from a non-human immunoglobulin. Humanization can be performed following the method of Winter and co-workers (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. (See also U.S. Patent No. 5,225,539.) In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies can also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the framework regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; and Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)).

Human Antibodies

Fully human antibodies relate to antibody molecules in which essentially the entire sequences of both the light chain and the heavy chain, including the CDRs, arise from human genes. Such antibodies are termed "human antibodies", or "fully human antibodies" herein. Human monoclonal antibodies can be prepared by the trioma technique; the human B-cell hybridoma technique (see Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72) and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (see Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Human monoclonal antibodies may be utilized in the practice of the present invention and may be produced by using human hybridomas (see Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) or by transforming human B-cells with Epstein Barr Virus in vitro (see Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

In addition, human antibodies can also be produced using additional techniques, including phage display libraries (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Similarly, human antibodies can be made by introducing human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in Marks et al. (Bio/Technology 10, 779-783 (1992)); Lonberg et al. (Nature 368 856-859 (1994)); Morrison (Nature 368, 812-13 (1994)); Fishwild et al,(Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996)); Neuberger (Nature Biotechnology 14, 826 (1996)); and Lonberg and Huszar (Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)).

Human antibodies may additionally be produced using transgenic nonhuman animals which are modified so as to produce fully human antibodies rather than the animal's endogenous antibodies in response to challenge by an antigen. (See PCT publication WO94/02602). The endogenous genes encoding the heavy and light immunoglobulin chains in the nonhuman host have been incapacitated, and active loci

encoding human heavy and light chain immunoglobulins are inserted into the host's genome. The human genes are incorporated, for example, using yeast artificial chromosomes containing the requisite human DNA segments. An animal which provides all the desired modifications is then obtained as progeny by crossbreeding intermediate transgenic animals containing fewer than the full complement of the modifications. The preferred embodiment of such a nonhuman animal is a mouse, and is termed the Xenomouse™ as disclosed in PCT publications WO 96/33735 and WO 96/34096. This animal produces B cells which secrete fully human immunoglobulins. The antibodies can be obtained directly from the animal after immunization with an immunogen of interest, as, for example, a preparation of a polyclonal antibody, or alternatively from immortalized B cells derived from the animal, such as hybridomas producing monoclonal antibodies. Additionally, the genes encoding the immunoglobulins with human variable regions can be recovered and expressed to obtain the antibodies directly, or can be further modified to obtain analogs of antibodies such as, for example, single chain Fv molecules.

An example of a method of producing a nonhuman host, exemplified as a mouse, lacking expression of an endogenous immunoglobulin heavy chain is disclosed in U.S. Patent No. 5,939,598. It can be obtained by a method including deleting the J segment genes from at least one endogenous heavy chain locus in an embryonic stem cell to prevent rearrangement of the locus and to prevent formation of a transcript of a rearranged immunoglobulin heavy chain locus, the deletion being effected by a targeting vector containing a gene encoding a selectable marker; and producing from the embryonic stem cell a transgenic mouse whose somatic and germ cells contain the gene encoding the selectable marker.

A method for producing an antibody of interest, such as a human antibody, is disclosed in U.S. Patent No. 5,916,771. It includes introducing an expression vector that contains a nucleotide sequence encoding a heavy chain into one mammalian host cell in culture, introducing an expression vector containing a nucleotide sequence encoding a light chain into another mammalian host cell, and fusing the two cells to form a hybrid cell. The hybrid cell expresses an antibody containing the heavy chain and the light chain.

In a further improvement on this procedure, a method for identifying a clinically relevant epitope on an immunogen, and a correlative method for selecting an antibody that

binds immunospecifically to the relevant epitope with high affinity, are disclosed in PCT publication WO 99/53049.

F_{ab} Fragments and Single Chain Antibodies

According to the invention, techniques can be adapted for the production of single-chain antibodies specific to an antigenic protein of the invention (see e.g., U.S. Patent No. 4,946,778). In addition, methods can be adapted for the construction of F_{ab} expression libraries (see e.g., Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal F_{ab} fragments with the desired specificity for a protein or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotypes to a protein antigen may be produced by techniques known in the art including, but not limited to: (i) an $F_{(ab')2}$ fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule; (ii) an F_{ab} fragment generated by reducing the disulfide bridges of an $F_{(ab')2}$ fragment; (iii) an F_{ab} fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent and (iv) F_v fragments.

Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for an antigenic protein of the invention. The second binding target is any other antigen, and advantageously is a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO

93/08829, published 13 May 1993, and in Traunecker *et al.*, 1991 *EMBO J.*, 10:3655-3659.

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g. $F(ab')_2$ bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan et al., Science 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F(ab')_2$ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the

other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Additionally, Fab' fragments can be directly recovered from E. coli and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody $F(ab')_2$ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from E. coli and subjected to directed chemical coupling in vitro to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See, Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Exemplary bispecific antibodies can bind to two different epitopes, at least one of which originates in the protein antigen of the invention. Alternatively, an anti-antigenic arm of an immunoglobulin molecule can be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3,

CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular antigen. Bispecific antibodies can also be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular antigen. These antibodies possess an antigen-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the protein antigen described herein and further binds tissue factor (TF).

Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). It is contemplated that the antibodies can be prepared in vitro using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

Effector Function Engineering

It can be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance, e.g., the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) can be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated can have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity can also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff et al. Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and can thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from Pseudomonas aeruginosa), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, and ^{186}Re.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as

dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

In another embodiment, the antibody can be conjugated to a "receptor" (such streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) that is in turn conjugated to a cytotoxic agent.

CRF2-12 Recombinant Expression Vectors and Host Cells

Another aspect of the invention pertains to vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding a CRF2-12 protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively-linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of

vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The recombinant expression vectors of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell, which means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression, that is operatively-linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Within a recombinant expression vector, "operably-linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner that allows for expression of the nucleotide sequence (*e.g.*, in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell).

The term "regulatory sequence" is intended to includes promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Regulatory sequences include those that direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cell and those that direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (*e.g.*, tissue-specific regulatory sequences). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or peptides, including fusion proteins or peptides, encoded by nucleic acids as described herein (*e.g.*, CRF2-12 proteins, mutant forms of CRF2-12 proteins, fusion proteins, etc.).

The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of CRF2-12 proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, CRF2-12 proteins can be expressed in bacterial cells such as *Escherichia coli*, insect cells (using baculovirus expression vectors) yeast cells or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Alternatively, the

recombinant expression vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *Escherichia coli* with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: (*i*) to increase expression of recombinant protein; (*ii*) to increase the solubility of the recombinant protein; and (*iii*) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. Often, in fusion expression vectors, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) that fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

Examples of suitable inducible non-fusion *E. coli* expression vectors include pTrc (Amrann *et al.*, (1988) *Gene* 69:301-315) and pET 11d (Studier *et al.*, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

One strategy to maximize recombinant protein expression in *E. coli* is to express the protein in a host bacteria with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein. *See, e.g.,* Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those preferentially utilized in *E. coli* (*see, e.g.,* Wada, *et al.*, 1992. *Nucl. Acids Res.* 20: 2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA synthesis techniques.

In another embodiment, the CRF2-12 expression vector is a yeast expression vector. Examples of vectors for expression in yeast *Saccharomyces cerivisae* include pYepSec1 (Baldari, *et al.*, 1987. *EMBO J.* 6: 229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, 1982. *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, 1987. *Gene* 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), and picZ (InVitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternatively, CRF2-12 can be expressed in insect cells using baculovirus expression vectors. Baculovirus vectors available for expression of proteins in cultured insect cells (*e.g.*, SF9 cells) include the pAc series (Smith, *et al.*, 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165) and the pVL series (Lucklow and Summers, 1989. *Virology* 170: 31-39).

In yet another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector. Examples of mammalian expression vectors include pCDM8 (Seed, 1987. *Nature* 329: 840) and pMT2PC (Kaufman, *et al.*, 1987. *EMBO J.* 6: 187-195). When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, adenovirus 2, cytomegalovirus, and simian virus 40. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells see, *e.g.*, Chapters 16 and 17 of Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (*e.g.*, tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid). Tissue-specific regulatory elements are known in the art. Non-limiting examples of suitable tissue-specific promoters include the albumin promoter (liver-specific; Pinkert, *et al.*, 1987. *Genes Dev.* 1: 268-277), lymphoid-specific promoters (Calame and Eaton, 1988. *Adv. Immunol.* 43: 235-275), in particular promoters of T cell receptors (Winoto and Baltimore, 1989. *EMBO J.* 8: 729-733) and immunoglobulins (Banerji, *et al.*, 1983. *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore, 1983. *Cell* 33: 741-748), neuron-specific promoters (*e.g.*, the neurofilament promoter; Byrne and Ruddle, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477), pancreas-specific promoters (Edlund, *et al.*, 1985. *Science* 230: 912-916), and mammary gland-specific promoters (*e.g.*, milk whey promoter; U.S. Pat. No. 4,873,316

and European Application Publication No. 264,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, *e.g.*, the murine hox promoters (Kessel and Gruss, 1990. *Science* 249: 374-379) and the α-fetoprotein promoter (Campes and Tilghman, 1989. *Genes Dev.* 3: 537-546).

The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operatively-linked to a regulatory sequence in a manner that allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule that is antisense to CRF2-12 mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen that direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen that direct constitutive, tissue specific or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced. For a discussion of the regulation of gene expression using antisense genes *see, e.g.*, Weintraub, *et al.*, "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," *Reviews-Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

Another aspect of the invention pertains to host cells into which a recombinant expression vector of the invention has been introduced. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but also to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, CRF2-12 protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as human, Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

Vector DNA can be introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms

"transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (*e.g.*, DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Suitable methods for transforming or transfecting host cells can be found in Sambrook, *et al.* (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), and other laboratory manuals.

For stable transfection of mammalian cells, it is known that, depending upon the expression vector and transfection technique used, only a small fraction of cells may integrate the foreign DNA into their genome. In order to identify and select these integrants, a gene that encodes a selectable marker (*e.g.*, resistance to antibiotics) is generally introduced into the host cells along with the gene of interest. Various selectable markers include those that confer resistance to drugs, such as G418, hygromycin and methotrexate. Nucleic acid encoding a selectable marker can be introduced into a host cell on the same vector as that encoding CRF2-12 or can be introduced on a separate vector. Cells stably transfected with the introduced nucleic acid can be identified by drug selection (*e.g.*, cells that have incorporated the selectable marker gene will survive, while the other cells die).

A host cell of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (*i.e.*, express) CRF2-12 protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing CRF2-12 protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of invention (into which a recombinant expression vector encoding CRF2-12 protein has been introduced) in a suitable medium such that CRF2-12 protein is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating CRF2-12 protein from the medium or the host cell.

Transgenic CRF2-12 Animals

The host cells of the invention can also be used to produce non-human transgenic animals. For example, in one embodiment, a host cell of the invention is a fertilized oocyte or an embryonic stem cell into which CRF2-12 protein-coding sequences have been introduced. Such host cells can then be used to create non-human transgenic animals in which exogenous CRF2-12 sequences have been introduced into their genome or

homologous recombinant animals in which endogenous CRF2-12 sequences have been altered. Such animals are useful for studying the function and/or activity of CRF2-12 protein and for identifying and/or evaluating modulators of CRF2-12 protein activity. As used herein, a "transgenic animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a rodent such as a rat or mouse, in which one or more of the cells of the animal includes a transgene. Other examples of transgenic animals include non-human primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, etc. A transgene is exogenous DNA that is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops and that remains in the genome of the mature animal, thereby directing the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal. As used herein, a "homologous recombinant animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a mouse, in which an endogenous CRF2-12 gene has been altered by homologous recombination between the endogenous gene and an exogenous DNA molecule introduced into a cell of the animal, *e.g.*, an embryonic cell of the animal, prior to development of the animal.

A transgenic animal of the invention can be created by introducing CRF2-12 -encoding nucleic acid into the male pronuclei of a fertilized oocyte (*e.g.*, by microinjection, retroviral infection) and allowing the oocyte to develop in a pseudopregnant female foster animal. Sequences including SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 can be introduced as a transgene into the genome of a non-human animal. Alternatively, a non-human homologue of the human CRF2-12 gene, such as a mouse CRF2-12 gene, can be isolated based on hybridization to the human CRF2-12 cDNA (described further *supra*) and used as a transgene. Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific regulatory sequence(s) can be operably-linked to the CRF2-12 transgene to direct expression of CRF2-12 protein to particular cells. Methods for generating transgenic animals via embryo manipulation and microinjection, particularly animals such as mice, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866; 4,870,009; and 4,873,191; and Hogan, 1986. In: MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Similar methods are used for production of other transgenic animals. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of the CRF2-12 transgene in its genome and/or expression of CRF2-12 mRNA

in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the transgene. Moreover, transgenic animals carrying a transgene-encoding CRF2-12 protein can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

To create a homologous recombinant animal, a vector is prepared which contains at least a portion of a CRF2-12 gene into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, *e.g.*, functionally disrupt, the CRF2-12 gene. The CRF2-12 gene can be a human gene (*e.g.*, the DNA of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11), but more preferably, is a non-human homologue of a human CRF2-12 gene. For example, a mouse homologue of human CRF2-12 gene of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11 can be used to construct a homologous recombination vector suitable for altering an endogenous CRF2-12 gene in the mouse genome. In one embodiment, the vector is designed such that, upon homologous recombination, the endogenous CRF2-12 gene is functionally disrupted (*i.e.*, no longer encodes a functional protein; also referred to as a "knock out" vector).

Alternatively, the vector can be designed such that, upon homologous recombination, the endogenous CRF2-12 gene is mutated or otherwise altered but still encodes functional protein (*e.g.*, the upstream regulatory region can be altered to thereby alter the expression of the endogenous CRF2-12 protein). In the homologous recombination vector, the altered portion of the CRF2-12 gene is flanked at its 5'- and 3'-termini by additional nucleic acid of the CRF2-12 gene to allow for homologous recombination to occur between the exogenous CRF2-12 gene carried by the vector and an endogenous CRF2-12 gene in an embryonic stem cell. The additional flanking CRF2-12 nucleic acid is of sufficient length for successful homologous recombination with the endogenous gene. Typically, several kilobases of flanking DNA (both at the 5'- and 3'-termini) are included in the vector. *See, e.g.,* Thomas, *et al.*, 1987. *Cell* 51: 503 for a description of homologous recombination vectors. The vector is ten introduced into an embryonic stem cell line (*e.g.*, by electroporation) and cells in which the introduced CRF2-12 gene has homologously-recombined with the endogenous CRF2-12 gene are selected. *See, e.g.*, Li, *et al.*, 1992. *Cell* 69: 915.

The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (*e.g.*, a mouse) to form aggregation chimeras. *See, e.g.*, Bradley, 1987. In: TERATOCARCINOMAS AND

EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, ed. IRL, Oxford, pp. 113-152. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term. Progeny harboring the homologously-recombined DNA in their germ cells can be used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously-recombined DNA by germline transmission of the transgene. Methods for constructing homologous recombination vectors and homologous recombinant animals are described further in Bradley, 1991. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 823-829; PCT International Publication Nos.: WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968; and WO 93/04169.

In another embodiment, transgenic non-humans animals can be produced that contain selected systems that allow for regulated expression of the transgene. One example of such a system is the cre/loxP recombinase system of bacteriophage P1. For a description of the cre/loxP recombinase system, *See, e.g.*, Lakso, *et al.*, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236. Another example of a recombinase system is the FLP recombinase system of *Saccharomyces cerevisiae. See,* O'Gorman, *et al.*, 1991. *Science* 251:1351-1355. If a cre/loxP recombinase system is used to regulate expression of the transgene, animals containing transgenes encoding both the Cre recombinase and a selected protein are required. Such animals can be provided through the construction of "double" transgenic animals, *e.g.*, by mating two transgenic animals, one containing a transgene encoding a selected protein and the other containing a transgene encoding a recombinase.

Clones of the non-human transgenic animals described herein can also be produced according to the methods described in Wilmut, *et al.*, 1997. *Nature* 385: 810-813. In brief, a cell (*e.g.*, a somatic cell) from the transgenic animal can be isolated and induced to exit the growth cycle and enter G_0 phase. The quiescent cell can then be fused, *e.g.*, through the use of electrical pulses, to an enucleated oocyte from an animal of the same species from which the quiescent cell is isolated. The reconstructed oocyte is then cultured such that it develops to morula or blastocyte and then transferred to pseudopregnant female foster animal. The offspring borne of this female foster animal will be a clone of the animal from which the cell (*e.g.*, the somatic cell) is isolated.

Pharmaceutical Compositions

The CRF2-12 nucleic acid molecules, CRF2-12 proteins, and anti-CRF2-12 antibodies (also referred to herein as "active compounds") of the invention, and derivatives, fragments, analogs and homologs thereof, can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration. Such compositions typically comprise the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Suitable carriers are described in the most recent edition of Remington's Pharmaceutical Sciences, a standard reference text in the field, which is incorporated herein by reference. Preferred examples of such carriers or diluents include, but are not limited to, water, saline, finger's solutions, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils may also be used. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

The antibodies disclosed herein can also be formulated as immunoliposomes. Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in Martin et al ., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) via a disulfide-interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (*i.e.*, topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); buffers such as acetates, citrates or phosphates, and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as manitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (*e.g.*, a CRF2-12 protein or anti-CRF2-12 antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, *e.g.*, a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active

compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

The compounds can also be prepared in the form of suppositories (*e.g.*, with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals.

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 5,328,470) or by stereotactic injection (*see, e.g.*, Chen, *et al.*, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057). The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene

delivery vector can be produced intact from recombinant cells, *e.g.*, retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells that produce the gene delivery system.

Antibodies specifically binding a protein of the invention, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed herein, can be administered for the treatment of various disorders in the form of pharmaceutical compositions. Principles and considerations involved in preparing such compositions, as well as guidance in the choice of components are provided, for example, in Remington : The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa. : 1995; Drug Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York. If the antigenic protein is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. See, *e.g.*, Marasco *et al.*, 1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893. The formulation herein can also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition can comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended. The active ingredients can also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions.

The formulations to be used for in vivo administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations can be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT ™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods.

The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

Screening and Detection Methods

The isolated nucleic acid molecules of the invention can be used to express CRF2-12 protein (*e.g.*, via a recombinant expression vector in a host cell in gene therapy applications), to detect CRF2-12 mRNA (*e.g.*, in a biological sample) or a genetic lesion in a CRF2-12 gene, and to modulate CRF2-12 activity, as described further, below. In addition, the CRF2-12 proteins can be used to screen drugs or compounds that modulate the CRF2-12 protein activity or expression as well as to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of CRF2-12 protein or production of CRF2-12 protein forms that have decreased or aberrant activity compared to CRF2-12 wild-type protein . In addition, the anti-CRF2-12 antibodies of the invention can be used to detect and isolate CRF2-12 proteins and modulate CRF2-12 activity. For example, CRF2-12 activity includes T-cell or NK cell growth and differentiation, antibody production, and tumor growth.

The invention further pertains to novel agents identified by the screening assays described herein and uses thereof for treatments as described, *supra*.

Screening Assays

The invention provides a method (also referred to herein as a "screening assay") for identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds or agents (*e.g.*, peptides, peptidomimetics, small molecules or other drugs) that bind to CRF2-12 proteins or have a stimulatory or inhibitory effect on, *e.g.*, CRF2-12 protein expression or CRF2-12 protein activity. The invention also includes compounds identified in the screening assays described herein.

In one embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which bind to or modulate the activity of the membrane-bound form of a CRF2-12 protein or polypeptide or biologically-active portion thereof. The test compounds of the invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the "one-bead one-compound" library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds. *See, e.g.*, Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145.

A "small molecule" as used herein, is meant to refer to a composition that has a molecular weight of less than about 5 kD and most preferably less than about 4 kD. Small molecules can be, *e.g.*, nucleic acids, peptides, polypeptides, peptidomimetics, carbohydrates, lipids or other organic or inorganic molecules. Libraries of chemical and/or biological mixtures, such as fungal, bacterial, or algal extracts, are known in the art and can be screened with any of the assays of the invention.

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt, *et al.*, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6909; Erb, *et al.*, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11422; Zuckermann, *et al.*, 1994. *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho, *et al.*, 1993. *Science* 261: 1303; Carrell, *et al.*, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell, *et al.*, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; and Gallop, *et al.*, 1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Libraries of compounds may be presented in solution (*e.g.*, Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421), or on beads (Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84), on chips

(Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556), bacteria (Ladner, U.S. Patent No. 5,223,409), spores (Ladner, U.S. Patent 5,233,409), plasmids (Cull, *et al.*, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) or on phage (Scott and Smith, 1990. *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990. *Science* 249: 404-406; Cwirla, *et al.*, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6378-6382; Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; Ladner, U.S. Patent No. 5,233,409.).

In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a membrane-bound form of CRF2-12 protein, or a biologically-active portion thereof, on the cell surface is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to a CRF2-12 protein determined. The cell, for example, can be of mammalian origin or a yeast cell. Determining the ability of the test compound to bind to the CRF2-12 protein can be accomplished, for example, by coupling the test compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the test compound to the CRF2-12 protein or biologically-active portion thereof can be determined by detecting the labeled compound in a complex. For example, test compounds can be labeled with ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, or ^{3}H, either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, test compounds can be enzymatically-labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product. In one embodiment, the assay comprises contacting a cell which expresses a membrane-bound form of CRF2-12 protein, or a biologically-active portion thereof, on the cell surface with a known compound which binds CRF2-12 to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a CRF2-12 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a CRF2-12 protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to CRF2-12 protein or a biologically-active portion thereof as compared to the known compound.

In another embodiment, an assay is a cell-based assay comprising contacting a cell expressing a membrane-bound form of CRF2-12 protein, or a biologically-active portion thereof, on the cell surface with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate (*e.g.*, stimulate or inhibit) the activity of the CRF2-12 protein or biologically-active portion thereof. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of CRF2-12 or a biologically-active portion thereof can be

accomplished, for example, by determining the ability of the CRF2-12 protein to bind to or interact with a CRF2-12 target molecule. As used herein, a "target molecule" is a molecule with which a CRF2-12 protein binds or interacts in nature, for example, a molecule on the surface of a cell which expresses a CRF2-12 interacting protein, a molecule on the surface of a second cell, a molecule in the extracellular milieu, a molecule associated with the internal surface of a cell membrane or a cytoplasmic molecule. A CRF2-12 target molecule can be a non-CRF2-12 molecule or a CRF2-12 protein or polypeptide of the invention In one embodiment, a CRF2-12 target molecule is a component of a signal transduction pathway that facilitates transduction of an extracellular signal (*e.g.* a signal generated by binding of a compound to a membrane-bound CRF2-12 molecule) through the cell membrane and into the cell. The target, for example, can be a second intercellular protein that has catalytic activity or a protein that facilitates the association of downstream signaling molecules with CRF2-12 .

Determining the ability of the CRF2-12 protein to bind to or interact with a CRF2-12 target molecule can be accomplished by one of the methods described above for determining direct binding. In one embodiment, determining the ability of the CRF2-12 protein to bind to or interact with a CRF2-12 target molecule can be accomplished by determining the activity of the target molecule. For example, the activity of the target molecule can be determined by detecting induction of a cellular second messenger of the target (*i.e.* intracellular Ca^{2+}, diacylglycerol, IP_3, etc.), detecting catalytic/enzymatic activity of the target an appropriate substrate, detecting the induction of a reporter gene (comprising a CRF2-12 -responsive regulatory element operatively linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, *e.g.*, luciferase), or detecting a cellular response, for example, cell survival, cellular differentiation, or cell proliferation.

In yet another embodiment, an assay of the invention is a cell-free assay comprising contacting a CRF2-12 protein or biologically-active portion thereof with a test compound and determining the ability of the test compound to bind to the CRF2-12 protein or biologically-active portion thereof. Binding of the test compound to the CRF2-12 protein can be determined either directly or indirectly as described above. In one such embodiment, the assay comprises contacting the CRF2-12 protein or biologically-active portion thereof with a known compound which binds CRF2-12 to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test

compound to interact with a CRF2-12 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a CRF2-12 protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to CRF2-12 or biologically-active portion thereof as compared to the known compound.

In still another embodiment, an assay is a cell-free assay comprising contacting CRF2-12 protein or biologically-active portion thereof with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate (*e.g.* stimulate or inhibit) the activity of the CRF2-12 protein or biologically-active portion thereof. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of CRF2-12 can be accomplished, for example, by determining the ability of the CRF2-12 protein to bind to a CRF2-12 target molecule by one of the methods described above for determining direct binding. In an alternative embodiment, determining the ability of the test compound to modulate the activity of CRF2-12 protein can be accomplished by determining the ability of the CRF2-12 protein further modulate a CRF2-12 target molecule. For example, the catalytic/enzymatic activity of the target molecule on an appropriate substrate can be determined as described above.

In yet another embodiment, the cell-free assay comprises contacting the CRF2-12 protein or biologically-active portion thereof with a known compound which binds CRF2-12 protein to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a CRF2-12 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a CRF2-12 protein comprises determining the ability of the CRF2-12 protein to preferentially bind to or modulate the activity of a CRF2-12 target molecule.

The cell-free assays of the invention are amenable to use of both the soluble form or the membrane-bound form of CRF2-12 protein. In the case of cell-free assays comprising the membrane-bound form of CRF2-12 protein, it may be desirable to utilize a solubilizing agent such that the membrane-bound form of CRF2-12 protein is maintained in solution. Examples of such solubilizing agents include non-ionic detergents such as n-octylglucoside, n-dodecylglucoside, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecypoly(ethylene glycol ether)$_n$, N-dodecyl--N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane

sulfonate, 3-(3-cholamidopropyl) dimethylamminiol-1-propane sulfonate (CHAPS), or 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO).

In more than one embodiment of the above assay methods of the invention, it may be desirable to immobilize either CRF2-12 protein or its target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to CRF2-12 protein, or interaction of CRF2-12 protein with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided that adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, GST-CRF2-12 fusion proteins or GST-target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtiter plates, that are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or CRF2-12 protein, and the mixture is incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described, *supra*. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of CRF2-12 protein binding or activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either the CRF2-12 protein or its target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated CRF2-12 protein or target molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques well-known within the art (*e.g.*, biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies reactive with CRF2-12 protein or target molecules, but which do not interfere with binding of the CRF2-12 protein to its target molecule, can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or CRF2-12 protein trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized

complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the CRF2-12 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays that rely on detecting an enzymatic activity associated with the CRF2-12 protein or target molecule.

In another embodiment, modulators of CRF2-12 protein expression are identified in a method wherein a cell is contacted with a candidate compound and the expression of CRF2-12 mRNA or protein in the cell is determined. The level of expression of CRF2-12 mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to the level of expression of CRF2-12 mRNA or protein in the absence of the candidate compound. The candidate compound can then be identified as a modulator of CRF2-12 mRNA or protein expression based upon this comparison. For example, when expression of CRF2-12 mRNA or protein is greater (*i.e.*, statistically significantly greater) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of CRF2-12 mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of CRF2-12 mRNA or protein is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of CRF2-12 mRNA or protein expression. The level of CRF2-12 mRNA or protein expression in the cells can be determined by methods described herein for detecting CRF2-12 mRNA or protein.

In yet another aspect of the invention, the CRF2-12 proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three hybrid assay (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos, *et al.*, 1993. *Cell* 72: 223-232; Madura, *et al.*, 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 12046-12054; Bartel, *et al.*, 1993. *Biotechniques* 14: 920-924; Iwabuchi, *et al.*, 1993. *Oncogene* 8: 1693-1696; and Brent WO 94/10300), to identify other proteins that bind to or interact with CRF2-12 ("CRF2-12 -binding proteins" or "CRF2-12 -bp") and modulate CRF2-12 activity. Such CRF2-12 -binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the CRF2-12 proteins as, for example, upstream or downstream elements of the CRF2-12 pathway.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for CRF2-12 is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*, GAL-4). In the other construct, a DNA sequence, from a library of DNA

sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming a CRF2-12 -dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ) that is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene that encodes the protein which interacts with CRF2-12 .

The invention further pertains to novel agents identified by the aforementioned screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

The invention will be further illustrated in the following non-limiting examples.

Example 1: Isolation of murine CRF2-12 sequences

Murine genomic and EST DNA databases were screened and certain clones were identified as containing homology to hCRF2-12. Based on this homology, the murine sequences containing sequences encoding the amino and carboxy terminal CRF-2-12 sequences were defined. Primers corresponding to the ends 5' and 3' ends of the ORF - ms15-6 (GGAACTCTGGTTGCCAGACAAGCACAC) (SEQ ID NO:13) and primer ms53-5 (reverse complement of CAAGGAGAGATGTGTGCAGATTCCATGA) (SEQ ID NO:14), respectively, were synthesized and used as primers in a PCR reaction. DNA products from these PCR reactions were cloned into pCRII TOPO vector by TA cloning and the plasmids were sequenced. The DNA and protein sequences are shown in Tables 7 and 8, respectively.

Example 2: Identification of regions of homology between human and murine CRF2-12 polypeptide sequences

The amino acid sequences of human CRF2-12 and murine CRF2-12 polypeptides were compared. The alignment is presented below. Alignments were prepared as described in Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10915-19, 1992. For the alignment shown, gap weight = 8, average match = 2.912, length weight = 2, average

mismatch = -2.003, quality =829, length = 1101, ratio = 3.589, gaps =1. The two proteins were found to be 69.565% similar and 66.957% identical.

```
832LcaaGlnQuuaLeuLSerSMMPKHCLLGLLI.ILLSSATEIQPARVSLTP 880
                        |||||||| || ||   |.     |    || |
  1 .....................MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKP 31
          .          .          .          .          .
881 QKVRFQSRNFHNILHWQAGSSLPSNNSIYFVQYKMYGQSQWEDKVDCWGT 930
    |:|.||||||||||| ||| | .|  |.|:|||||||.||| ||..| |||||
 32 QRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQWKNKEDCWGT 81
          .          .          .          .          .
931 TALFCDLTNETLDPYELYYGRVMTACAGRHSAWTRTPRFTPWWETKLDPP 980
      | ||||.|| |  | |||||  | || :| |. |||||||||||:|||
 82 QELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPP 131
          .          .          .          .          .
981 VVTITRVNASLRVLLRPPELPNRNQSGKNASMETYYGLVYRVFTINNSLE 1030
    |. ||.|| || |:|  | || | |  || |.| || |.|||| ||||||
132 VMNITQVNGSLLVILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLE 181
          .          .          .          .          .
1031 KEQKAYEGTQRAVEIEGLIPHSSYCVVAEMYQPMFDRRSPRSKERCVQIP 1080
    |||| |||  |||||| | ||||||||||.|||| |||| ||.||||:||
182 KEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPMLDRRSQRSEERCVEIP 231
```

The alignment reveals that the two proteins are 69.565% similar and 66.957% identical. Complete or nearly complete identity is detected for some regions of the two polypeptides, e.g., over polypeptide regions including the amino acids MMPKHCL/FLG L/FLI, (SEQ ID NO:13), FQSRNFHNILH/QWQ A/PG (SEQ ID NO:14), SI/VYFVQYKM/IYGQS/RQW (SEQ ID NO:15), TPRFTPWWETKL/IDPPV (SEQ ID NO:16), LV/LYRVFT/IINNSLEKEQKA/VYEG (SEQ ID NO:17), RAVEIEG/ALI/TPHSSYCVVAEM/IYQPM (SEQ ID NO:18), and DRRSP/QRSK/EERCVQ/EIP (SEQ ID NO:19).

Example 3: Tissue expression pattern of CRF2-12 RNA sequences

Expression of CRF2-12 sequences was examined using an Origene kit containing a panel of first strand cDNA sequences. Primers specific for hCRF2-12 sequences were used to probe RNA from a variety of tissues for the presence of CRF2-12 sequences. Relative expression levels were assigned using a "+" or "-" scoring system, with "-"

denoting no RNA sequences detected and "++++" denoting high expression. Lower relative levels of CRF2-12 RNA sequences were assigned potential scores of "+", "++", or "+++".

High levels (++++) of CRF2-12 transcripts were detected in placental and skin tissue. Low to moderate levels of CRF2-12 transcripts were detected in colon (+), prostate (+), small intestine (++), and spleen (++). No to low levels of CRF2-12 transcripts were detected in brain, kidney, liver, muscle, stomach, testes, thyroid, adrenal, pancreas, ovary, uterus, peripheral blood lymphocytes (PBL), bone marrow, fetal brain, and fetal liver (all (-)); and heart or salivary tissue (both (+/-)).

These results demonstrate that probes that recognize CRF2-12 nucleic acids and/or polypeptides are useful for detecting tissues in which CRF2-12 sequences are highly expressed, e.g., placental and skin tissue. Such probes can also be used to detect colon, prostate, small intestine, and spleen tissue. Absence of hybridization to probes that recognize CRF2-12 nucleic acids and/or polypeptides can also be used to verify the identity of tissues in which CRF2-12 is not expressed, e.g., stomach, testes, thyroid, adrenal, pancreas, ovary, uterus, peripheral blood lymphocytes (PBL), bone marrow, fetal brain, and fetal liver tissues.

Example 4. Construction of vectors including CRF2-12 nucleic acid sequences.

A murine CRF2-12 (mCRF2-112) cDNA was isolated as a Not I-HindIII restriction enzyme fragment from a TOPO vector. The fragment was subcloned into *HindIII* and *Not*I digested adenovirus vector Adore 1-2. The construct was verified by restriction digestion analysis and sequencing of the cDNA insert. In this vector, mCRF2-12 is under the control of the cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter and enhancer.

The construct is used to construct a replication-defective, E1/E3 deleted recombinant, type 5 (dl327) adenovirus by homologous recombination in human embryonic kidney 293 cells (ATCC, Rockville, Maryland).

Example 5. Construction of a fusion protein including a CRF2-12 polypeptide sequences

A fusion protein including CRF-2-12 polypeptide sequences is constructed from a fusion gene corresponding to all of the mCRF2-12 ORF fused to a mutated mouse IgG2a Fc domain. Primers are designed and used to amplify in a PCR reaction mCRF2-12 from the TOPO vector using a blunt-end PCR polymerase.

A fusion gene corresponding to all of the mCRF2-12 ORF fused to a mutated mouse IgG2a Fc domain is constructed using primers that PCR amplify mCRF2-12 from the TOPO vector using a blunt-end PCR polymerase. The 5' primer (VL334: GAATTCGTCGACCCACCATGCCTAAGCATTGCCTTC (SEQ ID NO:31) incorporates a SalI site and Kozak leader sequence upstream of mCRF2-12 sequence. The 3' primer is VL335: TGGAATCTGCACACATCTCTCC (SEQ ID NO:32). The PCR product was cut with SalI and ligated to a SalI and blunt FspI cut Gateway entry vector, pG352, that fused the PCR amplified mCRF2-12 in-frame to the hinge, CH2 and CH3 region sequences of a mutated IgG2a gene. The resulting transformation is a plasmid that contains an in-frame fusion of mCRF2-12 to mIgG2a hinge –CH2 – CH3. This fusion entry vector was then used to shuttle the insert into a retroviral Gateway destination vector, pG343. Cell lines are made that make and amplify retrovirus encoding a mCRF-12-FcG2am fusion gene.

The resulting construct is a plasmid that contains an in-frame fusion of mCRF2-12 to mIgG2a hinge –CH2 – CH3. This fusion entry vector is then used to shuttle the insert into a retroviral Gateway destination vector, pG343. Cell lines are constructed that make and amplify retrovirus encoding a mCRF-12-FcG2am fusion gene. This virus is used to transduce cells that are used in animal models of disease and that incorporate the adoptive transfer of these cells.

Example 6. Detection of a placental tissue using CRF2-12 nucleic acid sequence probes

A biological sample suspected of containing placental tissue is provided and RNA is recovered. The RNA is contacted with a probe that specifically detects CRF2-12 RNA samples Presence of CRF2-12 RNA indicates the sample contains placental tissue.

Example 7. Detection of skin tissue using CRF2-12 nucleic acid sequence probes

A biological sample suspected of containing skin tissue is provided and RNA is recovered. The RNA is contacted with a probe that specifically detects CRF2-12 RNA samples Presence of CRF2-12 RNA in the sample indicates the sample contains skin tissue.

Example 8. Detection of a placental tissue using probes that specifically detect CRF2-12 polypeptides

A biological sample suspected of containing placental tissue is provided and protein is recovered. The protein is contacted with an antibody probe that specifically binds a CRF2-12 polypeptide. Presence of CRF2-12 polypeptide in the sample indicates the sample contains placental tissue.

Example 9. Detection of skin tissue using probes that specifically detect CRF2-12 polypeptides

A biological sample suspected of containing skin tissue is provided and protein is recovered. The protein is contacted with an antibody probe that specifically binds a CRF2-12 polypeptide. Presence of CRF2-12 polypeptide in the sample indicates the sample contains skin tissue.

Example 10. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:20. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. A glutamine at position 23 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with an asparagine in the corresponding position in SEQ ID NO:20.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTNSTHESLKPQRVQFQSRNPHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:20)

Example 11. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:21. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. A histidine at position 26 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with an arginine in the corresponding position in SEQ ID NO:21.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTRESLKPQRVQFQSRNPHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:21)

Example 12. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:22. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. A glutamic acid at position 27 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with an aspartic acid in the corresponding position in SEQ ID NO:22.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHDSLKPQRVQFQSRNPHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:22)

Example 13. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:23. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. A leucine at position 29 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with a valine in the corresponding position in SEQ ID NO:23.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESVKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:23)

Example 14. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:24. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. A lysine at position 30 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with a histidine in the corresponding position in SEQ ID NO:24.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAgTQSTHESLHPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCwGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:24)

Example 15. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:25. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. An arginine at position 33 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with a lysine in the corresponding position in SEQ ID NO:25.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQKVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:25)

Example 16. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:26. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. An asparagine at position 40 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with a glutamine in the corresponding position in SEQ ID NO:26.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRQFHNILQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:26)

Example 17. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:27. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. A leucine at position 45 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with a valine in the corresponding position in SEQ ID NO:27.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNIVQWQPGRALTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:27)

Example 18. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:28. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. An alanine at position 52 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with a leucine in the corresponding position in SEQ ID NO:28.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAgTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRLLTGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV

ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:28)

Example 19. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:29. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. A leucine at position 53 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with an alanine in the corresponding position in SEQ ID NO:29.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGR**A**ATGNSSVYFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:29)

Example 20. A sequence variant of the disclosed CRF2-12 polypeptide amino acid sequence (SEQ ID NO:2)

A polypeptide sequence differing by one amino acid sequence from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 is shown in SEQ ID NO:30. The variant amino acid sequence is shown in bold-font. A valine at position 59 in the polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2 is replaced with an isoleucine in the corresponding position in SEQ ID NO:30.

MMPKHCFLGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHNILQWQPGRALTGNSS**I**YFVQYKIYGQRQW
KNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYYGRVRAASAGGSYSEWSMTPRFTPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLV
ILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFIINNSLEKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPML
DRRSQRSEERCVEIP (SEQ ID NO:30)

OTHER EMBODIMENTS

While the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

What is claimed is:

1. An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide comprising amino acids 21-66 of SEQ ID NO:2, or the complement of said nucleic acid molecule.

2. The nucleic acid molecule of claim 1, wherein said molecule encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6.

3. An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide comprising amino acids 21-66 of SEQ ID NO:2, or one or more substitutions relative to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or the complement of said nucleic acid molecule

4. The nucleic acid molecule of claim 3, wherein one or more of said amino acid substitutions are conservative amino acid substitutions.

5. An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:12.

6. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein said nucleic acid comprises SEQ ID NO:11.

7. The nucleic acid of claim 1, wherein said nucleic acid comprises nucleotides 62-197 of SEQ ID NO:1.

8. An oligonucleotide less than 100 nucleotides in length comprising at least 9 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:11

9. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 1.

10. A host cell comprising the vector of claim 8.

11. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid molecule of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

12. A substantially purified polypeptide comprising amino acids 21-66 of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:12.

13. The polypeptide of claim 12, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6.

14. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of claim 12 operably linked to a non-CRF2-12 polypeptide.

15. The fusion polypeptide of claim 14, wherein said non-CRF2-12 polypeptide comprises at least one member selected from the group consisting of an Fc region of an immunoglobulin molecules or a FLAG epitope, a HIS tag, and a MYC tag.

16 A pharmaceutical composition comprising the polypeptide of claim 12 and a pharmaceutically acceptable carrier.

17. An antibody that selectively binds to the polypeptide of claim 12.

18. A kit comprising in one or more containers a compound selected from the group consisting of an CRF2-12 nucleic acid, an CRF2-12 polypeptide and an antibody to an CRF2-12 polypeptide.

19. A method of producing a polypeptide, said method comprising culturing a cell comprising the nucleic acid molecule of claim 1 under conditions allowing for expression of a polypeptide encoded by said nucleic acid molecule.

20. A method of detecting the presence of a nucleic acid molecule of claim 1 in a sample, the method comprising contacting the sample with a nucleic acid probe or primer that selectively binds to the nucleic acid molecule and determining whether the nucleic acid probe or primer bound to the nucleic acid molecule of claim 1 is present in the sample.

21. A method of detecting the presence of the polypeptide of claim 12 in a sample, comprising contacting the sample with a compound that selectively binds to said polypeptide under conditions allowing for formation of a complex between said polypeptide and said compound, and detecting said complex, if present, thereby identifying said polypeptide in said sample.

22. A method of modulating the activity of the polypeptide of claim 12, the method comprising contacting a cell sample comprising said polypeptide with a compound that binds to said polypeptide in an amount sufficient to modulate the activity of the polypeptide.

23. A method of modulating the activity of interleukin-22 in a biological sample, the method comprising contacting said biological sample with the polypeptide of claim 12 in an amount sufficient to inhibit activity of IL-22 in said sample.

24. The method of claim 23, wherein said biological sample is provided in vivo.

25. A method for screening for a modulator of activity or of latency or predisposition to a cytokine-mediated immune disorder, the method comprising:

contacting a test compound with the polypeptide of claim 12; and

determining if said test compound binds to said polypeptide,

wherein binding of said test compound to said polypeptide indicates the test compound is a modulator of activity or of latency or predisposition to a cytokine-mediated immune disorder.

26. A method for screening for a modulator of activity or of latency or predisposition to a cytokine-mediated immune disorder, the method comprising:

administering a test compound to a test animal suffering from or at increased risk for said immune disorder, wherein said test animal recombinantly expresses a polypeptide encoded by the nucleic acid sequence of claim 1;

measuring expression of the activity of said polypeptide in said test animal;

measuring the activity of said polypeptide in a control animal that recombinantly expresses said polypeptide and is not at increased risk for said immune disorder; and

comparing expression of said polypeptide in said test animal and said control animal,

wherein a change in the activity of said polypeptide in said test animal relative to said control animal indicates the test compound is a modulator of latency of said immune disorder, and wherein said cytokine-mediated immune disorder is selected from the group consisting of an autoimmune disorder, a T-lymphocyte-associated disorder, a cell-proliferation disorder, a cell differentiation disorder, and an immune deficiency order.

27. The method of claim 26, wherein said test animal is a recombinant test animal that expresses a test protein transgene or expresses said transgene under the control of a promoter at an increased level relative to a wild-type test animal, and wherein said promoter is not the native gene promoter of said transgene.

28. A method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with altered levels of a polypeptide of claim 12 in a subject, the method comprising:

a) measuring the amount of said polypeptide in a sample from said subject; and

b) comparing the amount of the polypeptide in step (a) to the amount of the polypeptide present in a control sample,

wherein an alteration in the level of said polypeptide in step (a) as compared to the level of the polypeptide in said control sample indicates the presence of or predisposition to a disease in said subject.

29. The method of claim 28, wherein said subject is a human.

30. A method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with altered levels of a nucleic acid molecule of claim 1 in a subject, the method comprising:

a) measuring the amount of the nucleic acid in a sample from said subject; and

b) comparing the amount of said nucleic acid in step (a) to the amount of the nucleic acid present in a control sample,

wherein an alteration in the level of said nucleic acid in step (a) as compared to the level of the nucleic acid in the control sample indicates the presence of or predisposition to said disease in said subject.

31. The method of claim 30, wherein said subject is a human.

32. A method of treating or preventing a pathological condition associated with a cytokine-mediated disorder, the method comprising administering the polypeptide of

claim 12 to a subject in an amount sufficient to alleviate or prevent the pathological condition.

33. The method of claim 32, wherein said subject is a human.

34. A method of treating or preventing a pathological condition associated with an immune disorder, the method comprising administering the nucleic acid of claim 1 to a subject in an amount sufficient to treat or prevent the pathological condition.

35. The method of claim 34, wherein said subject is a human.

36. A method of treating or preventing a pathological condition, the method comprising administering the antibody of claim 16 to a subject in an amount sufficient to alleviate or prevent the pathological condition.

37. The method of claim 36, wherein said subject is a human.

38. A method of treating rheumatoid arthritis in a subject, the method comprising administering to the subject an agent that modulates the amount of a CRF2-12 polypeptide in said subject.

39. The method of claim 38, wherein said agent is a CRF2-12 nucleic acid or polypeptide.

40. The method of claim 38, wherein said subject is a human.

41. The method of claim 38, wherein said agent increases the amount of said CRF2-12 polypeptide in said subject.

42. The method of claim 38, wherein said agent decreases the amount of said CRF2-12 polypeptide in said subject.

43. The method of claim 42, wherein said agent is an anti-CRF2-12 antibody.

44. A method of treating multiple sclerosis in a subject, the method comprising administering to the subject an agent that modulates the amount of a CRF2-12 polypeptide in said subject.

45. The method of claim 44, wherein said agent is a CRF2-12 nucleic acid or polypeptide.

46. The method of claim 44, wherein said subject is a human.

47. The method of claim 44, wherein said agent increases the amount of said CRF2-12 polypeptide in said subject.

48. The method of claim 44, wherein said agent decreases the amount of said CRF2-12 polypeptide in said subject.

49. The method of claim 48, wherein said agent is an anti-CRF2-12 antibody.

50. A method of modulating vascular smooth muscle cell proliferation, the method comprising contacting a vascular smooth muscle cell with an agent that modulates the amount of CRF2-12 polypeptide in said cell.

51. The method of claim 50, wherein said agent is a CRF2-12 nucleic acid or polypeptide.

52. The method of claim 50, wherein said agent increases the amount of said CRF2-12 polypeptide in said vascular smooth muscle cell.

53. The method of claim 50, wherein said agent decreases the amount of said CRF2-12 polypeptide in said vascular smooth muscle cell.

54. The method of claim 50, wherein said agent is an anti-CRF2-12 antibody.

55. The method of claim 50, wherein said cell is provided in a subject *in vivo*.

56. The method of claim 50, wherein said subject is a human.

57. A method of treating or preventing inflammation in a subject, the method comprising administering to said subject an agent that modulates the amount of a CRF2-12 polypeptide in said subject.

58. The method of claim 57, wherein said subject is a human.

59. The method of claim 57, wherein said agent increases the amount of a CRF2-12 polypeptide in said subject.

60. The method of claim 59, wherein said agent is a CRF2-12 polypeptide.

61. The method of claim 59, wherein said agent is a CRF2-12 nucleic acid.

62. The method of claim 57, wherein said agent decreases the amount of a CRF2-12 polypeptide in said subject.

63. The method of claim 62, wherein said agent is a CRF2-12 antibody.

64. The method of claim 62, wherein said agent is a CRF2-12 anti-sense nucleic acid.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2002/066647 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 5/10, 15/62, C12Q 1/68, C07K 16/18, A61K 38/17, 39/00, 48/00, G01N 33/50, 33/53

(21) International Application Number: PCT/US2002/000986

(22) International Filing Date: 14 January 2002 (14.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/261,442	12 January 2001 (12.01.2001)	US
60/267,021	6 February 2001 (06.02.2001)	US
60/270,835	23 February 2001 (23.02.2001)	US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:

US	60/267,021 (CIP)
Filed on	6 February 2001 (06.02.2001)
US	60/261,442 (CIP)
Filed on	12 January 2001 (12.01.2001)
US	60/270,835 (CIP)
Filed on	23 February 2001 (23.02.2001)

(71) Applicant (*for all designated States except US*): GENETICS INSTITUTE, LLC. [US/US]; 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): FOUSER, Lynette [US/US]; 57 Hampton Street, Acton, MA 01720 (US). LIU, Wei [CN/US]; 266 Grove Street, #6, Auburndale, MA 02466 (US). DENG, Bijia [US/US]; 38 Coolidge Road, Allston, MA 02134 (US).

(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C., ., One Fiancial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report: 12 February 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2002/066647 A3

(54) Title: TYPE 2 CTOKINE RECEPTOR AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME

(57) Abstract: The present invention provides novel isolated CRF2-12 polynucleotides and polypeptides encoded by the CRF2-12 polynucleotides. Also provided are the antibodies that immunospecifically bind to a CRF2-12 polypeptide or any derivative (including fusion derivative), variant, mutant of the CRF2-12 polypeptide, polynucleotide or antibody. The invention additionally provides methods in which the CRF2-12 polypeptide, polynucleotide and antibody are utilized in the detection and treatment of a broad range of pathological states, as well as to other uses.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 02/00986

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C07K14/715 C12N5/10 C12N15/62 C12Q1/68
C07K16/18 A61K38/17 A61K39/00 A61K48/00 G01N33/50
G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBL, WPI Data, PAJ, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! standard; DNA; HUM; 113811 BP, 23 November 1999 (1999-11-23) PHILLIMORE B.: "Human DNA sequence from clone 503F13 on chromosome 6q24.1-25.2" Database accession no. AL050337 XP002230015 the whole document ---	1-4,7,9, 10
A	KOTENKO S V ET AL: "JAK-STAT SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY THROUGH THE EYES OF CYTOKINE CLASS II RECEPTOR COMPLEXES" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 21 R-I-2, no. 19, 15 May 2000 (2000-05-15), pages 2557-2565, XP008005927 ISSN: 0950-9232 the whole document --- -/--	1-64

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 February 2003	28/02/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Kools, P

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 02/00986

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	KOTENKO S V ET AL: "Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 166, no. 12, 15 June 2001 (2001-06-15), pages 7096-7103, XP002186668 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-4, 7-10, 12-15,17
P,X	DUMOUTIER L ET AL: "Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 166, no. 12, 15 June 2001 (2001-06-15), pages 7090-7095, XP002206182 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-4, 7-10, 12-15,17
P,X	XU WENFENG ET AL: "A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 98, no. 17, 14 August 2001 (2001-08-14), pages 9511-9516, XP002186667 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-4, 7-10, 12-15,17
P,X	GRUENBERG B H ET AL: "A novel, soluble homologue of the human IL-10 receptor with preferential expression in placenta" GENES AND IMMUNITY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 2, no. 6, October 2001 (2001-10), pages 329-334, XP001040302 ISSN: 1466-4879 the whole document	1-4, 7-10, 12-15,17
P,X	WO 01 36467 A (SCHERING CORP) 25 May 2001 (2001-05-25) Seq ID NOs 27 and 28	1-4,7-64
P,X	WO 01 40467 A (ZYMOGENETICS INC) 7 June 2001 (2001-06-07) Seq ID No 1 and Seq ID No 2	1-4,7-64

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 02/00986

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 01 46422 A (ZYMOGENETICS INC) 28 June 2001 (2001-06-28) Seq Id NOs 32 and 33	1-4,7-64
P,X	WO 01 98342 A (GLAXO GROUP LTD ;MURDOCK PAUL R (GB); SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB);) 27 December 2001 (2001-12-27) Seq ID 18 and 41	1-4,7-64
E	EP 1 191 035 A (SCHERING AG) 27 March 2002 (2002-03-27) the whole document	1-4,7-64
E	WO 02 24912 A (RENAULD JEAN CHRISTOPHE ;DUMOUTIER LAURE (BE); LUDWIG INST CANCER) 28 March 2002 (2002-03-28) the whole document	1-4,7-64
~	WO 02 70655 A ((ZYMO) ZYMOGENETICS) 12 September 2002 (2002-09-12) Seq ID NO 1 and 2	1-4,7-64

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

International Application No. PCT/US 02 00986

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 20, 21, and 25-31 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 22-24, and 32-64 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

..ational application No.
PCT/US 02/00986

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 02/00986

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0136467	A	25-05-2001	AU	1919201 A	30-05-2001
			EP	1230368 A2	14-08-2002
			WO	0136467 A2	25-05-2001
WO 0140467	A	07-06-2001	AU	2253301 A	12-06-2001
			EP	1234035 A1	28-08-2002
			WO	0140467 A1	07-06-2001
			US	2002012669 A1	31-01-2002
WO 0146422	A	28-06-2001	AU	2292601 A	03-07-2001
			EP	1242600 A1	25-09-2002
			WO	0146422 A1	28-06-2001
WO 0198342	A	27-12-2001	AU	6867101 A	02-01-2002
			WO	0198342 A1	27-12-2001
EP 1191035	A	27-03-2002	DE	10048626 A1	25-04-2002
			DE	10058907 A1	06-06-2002
			DE	10064906 A1	20-06-2002
			EP	1191035 A2	27-03-2002
			JP	2002355059 A	10-12-2002
WO 0224912	A	28-03-2002	AU	9291801 A	02-04-2002
			WO	0224912 A2	28-03-2002
WO 0270655	A	12-09-2002	WO	02070655 A2	12-09-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 45/00	Ａ６１Ｋ 45/00		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ 9/00	Ａ６１Ｐ 9/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ 19/02	Ａ６１Ｐ 19/02		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 25/00	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 29/00		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 37/02	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 37/06	Ａ６１Ｐ 37/02		
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 37/06		
Ｃ０７Ｋ 14/715	Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	
Ｃ０７Ｋ 16/00	Ｃ０７Ｋ 14/715		
Ｃ０７Ｋ 16/28	Ｃ０７Ｋ 16/00		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 16/28		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｑ 1/02	Ｃ１２Ｑ 1/02		
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
	Ｇ０１Ｎ 33/566		
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		

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

(72)発明者 ファウザー, ライネット
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７２０, アクトン, ハンプトン ストリート ５７
(72)発明者 リウ, ウェイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４６６, アウバーンデール, グローブ ストリート ２６６, ナンバー６
(72)発明者 デン, ビジア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３４, オールストン, クーリッジ ロード ３８

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA01 CA04 CA09 CA11 DA02 DA05
DA11 EA02 EA03 EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA11
4B063 QA01 QA08 QA18 QQ05 QQ13 QQ42 QQ52 QR08 QR33 QR42
QR55 QR59 QR62 QR74 QR80 QR82 QS05 QS25 QS36 QX02
4B064 AG20 AG27 CA01 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA90X AA91Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA06 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18
DC50 NA14 ZA021 ZA022 ZA361 ZA362 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072
ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 CC03 DD01 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 BC42 BC43 CB07 DA38 EA17 EA18 MA01
MA04 NA14 ZA02 ZA36 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA02 ZA36 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11
ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA51 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004533811A5	公开(公告)日	2006-01-26
申请号	JP2002566352	申请日	2002-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	遺传学研究所有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	遺传学研究所有限责任公司		
[标]发明人	ファウザーライネット リウウェイ デンビジア		
发明人	ファウザー, ライネット リウ, ウェイ デン, ビジア		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/715 C07K16/00 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 A61K38/00		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61K2039/53 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/715 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P9/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00.111 C07K14/715 C07K16/00 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA022 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC03 4C085/DD01 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/BC42 4C086/BC43 4C086/CB07 4C086/DA38 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA36 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA36 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/261442 2001-01-12 US 60/267021 2001-02-06 US 60/270835 2001-02-23 US		

其他公开文献	JP2004533811A

摘要(译)

本发明提供了分离的新型CRF2-12多核苷酸和由CRF2-12多核苷酸编码的多肽。还提供了免疫特异性结合CRF2-12多肽或CRF2-12多肽，多核苷酸或任何衍生物（包括融合衍生物），变体，抗体变体的抗体。本发明进一步提供了方法，其中CRF2-12多肽，多核苷酸和抗体用于检测和治疗多种病理状况，以及用于其他用途。