

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 516719

(P2003 - 516719A)

(43)公表日 平成15年5月20日(2003.5.20)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 6 3
38/00			N 4 B 0 6 4
39/395		45/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全125数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 521740(P2001 - 521740)

(86)(22)出願日 平成12年8月31日(2000.8.31)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月4日(2002.3.4)

(86)国際出願番号 PCT/US00/24220

(87)国際公開番号 W001/018204

(87)国際公開日 平成13年3月15日(2001.3.15)

(31)優先権主張番号 60/152,383

(32)優先日 平成11年9月3日(1999.9.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/172,909

(32)優先日 平成11年12月21日(1999.12.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 キュラジェン コーポレイション  
アメリカ合衆国 コネチカット州 06511  
ニュー ハイブン ロング ウォーフ ド  
ライブ 555

(71)出願人 バイオジェン インコーポレイテッド  
B I O G E N I N C O R P O R A T E  
D  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ 0214  
2、ケンブリッジ、ケンブリッジ センター  
14

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトBリンパ球活性化抗原B7ファミリーのメンバーをコードするポリヌクレオチドおよびこれらによりコードされるポリペプチド

(57)【要約】

本発明は、新規単離されたB L A AポリヌクレオチドおよびB L A Aポリヌクレオチドによりコードされる膜結合ポリペプチドまたは分泌ポリペプチドを提供する。B L A AポリペプチドまたはB L A A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體、改変体、変異体もしくはフラグメントに免疫特異的に結合する抗体もまた、提供される。本発明はさらに、B L A Aポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体が広範な病理学的状態の検出および処置において使用される方法、ならびに他の用途に対する方法を提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 Bリンパ球活性化抗原（「BLAA」）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であって、ここで該分子は、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6と少なくとも95%同一である配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項2】 請求項1に記載の核酸分子または該核酸分子の相補体であって、ここで該分子は、配列番号1、配列番号3もしくは配列番号5のヌクレオチドの配列を含む核酸分子と相補的な核酸配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、核酸分子。

【請求項3】 前記ヌクレオチド配列がヒトBLAAをコードする、請求項1の核酸分子。

【請求項4】 請求項1に記載の核酸分子であって、ここで、該分子は、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のアミノ酸配列、または配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のアミノ酸配列における1以上の保存的置換を含むアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、核酸分子。

【請求項5】 請求項1に記載の核酸分子または該核酸分子の相補体であって、ここで該分子は、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、核酸分子。

【請求項6】 100ヌクレオチド長未満のオリゴヌクレオチドであり、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11もしくは配列番号12の少なくとも6個連続したヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチド、またはそれらの相補体。

【請求項7】 請求項1に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項8】 前記ベクターが発現ベクターである、請求項7に記載のベクター。

【請求項9】 前記核酸分子に作動可能に連結された調節エレメントをさらに含む、請求項7に記載のベクター。

【請求項10】 単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、以下：

(a) 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ポリペプチド；

(b) 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ポリペプチドのフラグメントであって、ここで該フラグメントは、配列番号2、配列番号4または配列番号6の少なくとも6個連続したアミノ酸を含む、フラグメント；

(c) 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、ポリペプチドの誘導体；

(d) 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ポリペプチドのアナログ；

(e) 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ポリペプチドのホモログ；

(f) 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ポリペプチドの、天然に存在する対立遺伝子改変体であって、ここで該ポリペプチドは、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3または配列番号5の核酸分子にハイブリダイズする核酸分子によりコードされる、改変体、からなる群より選択されるポリペプチドと少なくとも80%同一である、ポリペプチド。

【請求項11】 請求項10に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチドまたはそのフラグメントは、ヒトBリンパ球活性化抗原B7様活性を有する、ポリペプチド。

【請求項12】 請求項10のポリペプチドに選択的に結合する、抗体。

【請求項13】 請求項10に記載のポリペプチドを産生する方法であって、該方法は、前記核酸分子が発現される条件下で宿主細胞を培養する工程を包含する、方法。

【請求項14】 サンプル中の請求項10に記載のポリペプチドの存在を検出する方法であって、該方法は、請求項10に記載のポリペプチドに選択的に結合する化合物と該サンプルとを接触させる工程、および請求項10に記載のポリペプチドに結合する化合物が、該サンプル中に存在するか否かを決定する工程を

包含する、方法。

【請求項15】 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、該方法は、請求項1に記載の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該サンプルとを接触させる工程、および請求項1に記載の核酸分子に結合する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か否かを決定する工程を包含する、方法。

【請求項16】 請求項10に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、請求項10に記載のポリペプチドを含む細胞サンプルを該ポリペプチドの活性を調節するに十分な量で該ポリペプチドに結合する化合物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項17】 免疫応答関連障害を処置または予防する方法であって、該方法は、以下：

- (a) 請求項1に記載の核酸；
- (b) 請求項10に記載のポリペプチド；および
- (c) 請求項12に記載の抗体、

からなる群より選択される有効量の治療剤を、このような処置または予防が所望される被検体へ投与する工程を包含し、ここで、該治療剤は、該被検体における該免疫応答関連障害を処置するに十分な量で投与される、方法。

【請求項18】 薬学的組成物であって、該組成物は、以下：

- (a) 請求項1に記載の核酸；
- (b) 請求項10に記載のポリペプチド；および
- (c) 請求項12に記載の抗体、

からなる群より選択される治療的または予防的に有効量の治療剤、ならびに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19】 1以上に容器中に、治療的または予防的に有効量の請求項18に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項20】 ヒト疾患に関連する症状を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患は、免疫応答関連障害を含み、ここで該治療剤は、以下：

- (a) 請求項1に記載の核酸；
  - (b) 請求項10に記載のポリペプチド；および
  - (c) 請求項12に記載の抗体、
- からなる群より選択される、使用。

【請求項21】 免疫応答関連障害の活性もしくは潜伏のモジュレーターまたは該免疫応答関連障害に対する素因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：

(a) 免疫応答関連障害について増加した危険性である試験動物に試験化合物を投与する工程であって、ここで、該試験動物は、BLAAポリペプチドを組換え的に発現する、工程；

(b) 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；

(c) 該ポリペプチドを組換え的に発現し、かつ免疫応答関連疾患について増加した危険性ではない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；ならびに

(d) 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であって、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の変化は、該試験化合物が、免疫応答関連疾患に対する活性もしくは潜伏のモジュレーターであるか、または免疫応答関連疾患に対する素因であることを示す、工程、

を包含する、方法。

【請求項22】 請求項21に記載の方法であって、ここで前記試験動物は、組換え試験動物であり、該組換え試験動物は、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野生型試験動物に対して増加したレベルで該導入遺伝子を発現し、そしてここで該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブなプロモーターではない、方法。

【請求項23】 請求項10に記載のBLAAポリペプチドの変更されたレベルと関連する疾患の存在または該疾患に対する素因を決定するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 哺乳動物被検体由来のサンプルにおける該ポリペプチドの量を測定する

工程：および

(b) 工程(a)における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と比較した場合の工程(a)における該ポリペプチドのレベルにおける変更が、疾患状態を示す、方法。

【請求項24】 請求項1に記載のBLAA核酸の変更されたレベルと関連する疾患の存在または該疾患に対する素因を決定するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 哺乳動物被検体由来のサンプルにおける該核酸の量を測定する工程；および

(b) 工程(a)における該核酸の量を、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と比較した場合の工程(a)における該核酸のレベルにおける変更が、疾患状態を示す、方法。

【請求項25】 哺乳動物における病理学的状態を処置する方法であって、該方法は、請求項10に記載のポリペプチドを該病理学的状態を緩和する量で被検体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項26】 哺乳動物における病理学的状態を処置する方法であって、該方法は、請求項12に記載の抗体を該病理学的状態を緩和するに十分な量で被検体に投与する工程を包含する、方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の分野)**

本発明は、一般的にポリヌクレオチドおよびそれによってコードされるポリペプチド、およびベクター、抗体ならびにこのポリペプチドおよびポリヌクレオチドを作製する組換え方法に関する。

**【0002】****(発明の背景)**

脊椎動物の免疫系は、「自己」を「非自己」から識別する能力および病原体および他の潜在的に有害な因子に対する適切な選択的応答を備える能力によって特徴付けられる。免疫応答に関与する細胞型としては、B細胞およびT細胞として公知であるリンパ球が挙げられる。B細胞とT細胞との間の相互作用は、完全な免疫応答の伝達のために重要である。

**【0003】**

T細胞は、免疫応答をもたらすために活性化されなければならない。T細胞の活性化には、以下の2つのシグナルが必要であると考えられる：抗原特異的シグナルおよび抗原特異的ではないシグナル。T細胞は、B細胞、特にT細胞自体を活性化するB細胞に結合することによって活性化され得る。

**【0004】**

T細胞のB細胞媒介活性化は、少なくとも部分的にB7タンパク質によって媒介されると考えられる。このB7タンパク質は、B細胞の表面上に発現されるタンパク質である。B7タンパク質は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。これらは、活性化されたTリンパ球に結合し、そしてTリンパ球細胞増殖および活性化のための調節シグナルを提供する(例えば、「Immunobiology - The Immune System in Health and Disease」、1997、第3版、第7章、Janeway, C. A.ら編、Garland Publishing Inc., New Yorkを参照のこと)。B7分子に結合するT細胞上の細胞表面分子としては、CTLA4およびCD28が挙げられる。

## 【0005】

## (発明の要旨)

本発明は、ヒトBリンパ球活性化抗原B7ファミリー(以下「BLAA」とする)の新規なメンバーをコードするBLAAポリヌクレオチド配列の発見に一部基づく。

## 【0006】

1つの局面において、本発明は、BLAAをコードする単離された核酸分子を含む。この核酸分子は、配列番号2または配列番号6に対して少なくとも95%同一である配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチドであり得る。あるいは、このような核酸分子の相補鎖であり得る。

## 【0007】

別の局面において、本発明は、100ヌクレオチド長未満であり、かつ配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、または12の少なくとも6個連続するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、または12の相補鎖の少なくとも6個連続するヌクレオチドを含む。

## 【0008】

本発明の別の局面は、上記のBLAAをコードする単離された核酸分子を含むベクターに関する。1つの実施形態において、このベクターは、発現ベクターである。別の実施形態において、このベクターは、単離された核酸分子に作動可能に連結される調節エレメントを含む。

## 【0009】

本発明のさらなる局面は、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドに少なくとも80%同一である単離されたポリペプチドを含む。本発明のこの局面の別の実施形態において、単離されたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドのフラグメントに少なくとも80%相同である。この実施形態において、このフラグメントは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6の少なくとも6個連続するアミノ酸を含む。本発明のこの局面の他の実施形態は、配列番

号2、配列番号4、または配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドの誘導体、アナログ、またはホモログに少なくとも80%相同である本発明の単離されたポリペプチドを必要とする。なお別の実施形態は、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子改変体に少なくとも80%同一である単離されたポリペプチドを含む。この実施形態は、ストリンジェントな条件下で配列番号1、配列番号3、または配列番号5の核酸分子にハイブリダイズし得る核酸分子によってコードされるポリペプチドを必要とする。

#### 【0010】

本発明の別の実施形態は、上記のポリペプチドに選択的に結合する抗体を含む。本発明のさらなる実施形態は、(a)核酸分子が発現される条件下で宿主細胞を培養することによってこのようなポリペプチドを産生する方法；(b)サンプルを、本発明のポリペプチドに選択的に結合する化合物と接触させることによってサンプル中のこのポリペプチドの存在を検出する方法；ならびに(c)本発明のポリペプチドを含む細胞サンプルを、このポリペプチドに結合し、その活性を調節する化合物と接触させることによってこのようなポリペプチドの活性を調節する方法を提供する。

#### 【0011】

さらに、本発明の核酸分子のうちの1つの存在を検出する方法が、また提供される。この方法は、サンプルを、本発明のポリペプチドに選択的に結合する化合物と接触させる工程およびこのポリペプチドに結合する化合物が、サンプル中に存在するか否かを決定する工程を包含する。

#### 【0012】

本発明の他の実施形態としては、免疫応答関連障害を処置または予防する方法および治療的薬学的組成物または予防的薬学的組成物が挙げられる。さらに、本発明の別の局面は、本発明において提供される、治療的または予防的有効量の薬学的組成物を含むキットを含む。

#### 【0013】

本発明の別の局面は、免疫応答障害と関連する疾患を処置する医薬の製造にお

ける治療剤の使用を含む。本発明の別の実施形態は、免疫応答関連障害の活性、潜伏または素因のモジュレーターをスクリーニングする方法を含む。この実施形態において、試験化合物が、免疫応答関連障害の危険性が上昇している動物に投与され、試験動物における本発明のポリペプチドの発現を測定し、コントロール動物におけるポリペプチドの発現を測定し、そして両方の動物における発現を比較する。

#### 【0014】

本発明の他の実施形態としては、BLAAポリペプチドまたはBLAA核酸のレベルの変化と関連する疾患の存在または素因を、サンプル中のBLAAポリペプチドまたは核酸の量を測定し、そしてコントロールサンプルにおける存在量と比較することによって決定する方法が挙げられる。本発明のなお他の実施形態は、哺乳動物において病理学的状態を緩和するのに十分な量でBLAAポリペプチドまたはBLAA核酸を投与することによって病理学的状態を処置する方法を含む。他で定義しない限り、本明細書中で使用される全ての技術単語および科学単語は、本発明に関係のある当業者によって一般的に理解されるのと同じの意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と同一または等価である方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および物質が、以下に記載される。本明細書中に記載される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が参考として援用される。競合する場合、定義を含む本願明細書は制御される。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみであり、そして限定することは意図されない。

#### 【0015】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および上記の特許請求の範囲から明らかである。

#### 【0016】

(発明の詳細な説明)

本発明は、Bリンパ球抗原(BLAA)のB7ファミリーに類似の配列を有するポリペプチドをコードする新規のポリヌクレオチドを提供する。本発明に従うこれらのcDNA配列は、これらのコードされるBLAAポリペプチドと共に、

図1、2および3に示される。

【0017】

B L A Aポリペプチドは、以前に記載されたB7ファミリーのメンバー（すなわち、B7-1およびB7-2）に20～25%同一であり、そして40～45%類似する。以下に詳細に議論されるように、これらのB L A Aポリペプチドのいくつかのモチーフは、B7ポリペプチドで高度に保存されている。さらに、ヒト、マウスおよびウシのブチロフィリン（*butyrophilin*）およびヒトミエリン稀突起神経膠細胞糖タンパク質（MOG）に対する匹敵する相同性が観察されている。

【0018】

本発明のポリペプチドは、2つ（配列番号2）、3つ（配列番号4）または4つ（配列番号6）のIg様ドメイン、それに続く、膜貫通ドメインおよび44アミノ酸の細胞質ドメインを有する。これは、細胞表面に局在することが公知の、以前に記載されたB7タンパク質ファミリーのメンバーと一致する（例えば、Selvakumarら、*Immunogenetics* 36:175-181（1992）およびLinskeyら、*Protein Sci* 3:1341-1343（1994）を参照のこと）。

【0019】

本明細書中で使用される場合、用語「ヒトBリンパ球活性化抗原B7様活性」は、活性化されたTリンパ球への結合ならびにTリンパ球の細胞増殖および活性化のための調節シグナルを提供することを包含する。

【0020】

従って、本発明のポリペプチドは、B7タンパク質ファミリーの新規メンバーである。本発明の核酸分子およびポリペプチドは、免疫応答を調節するために使用され得る。それ自体、これらは、感染性疾患、癌、自己免疫障害、および器官移植における対宿主性移植片病に関連する合併症、ならびに/あるいは類似の免疫系の病理および障害の処置に関する、潜在的な治療適用において有用である。例えば、本発明のポリペプチドをコードするcDNAは、遺伝子治療において有用であり得る。あるいは、B L A Aポリペプチドは、免疫障害を処置するために

直接投与され得る。本発明の核酸、ポリペプチドおよび抗体は、診断適用および治療適用においてさらに有用であり得る。

#### 【0021】

B L A Aポリペプチドは、他の相同なB7タンパク質において対応する位置で保存される、多くの領域および/または単一のアミノ酸を含む。例えば、図4は、配列番号6のポリペプチドのC l a s t a l Wアライメントを示す。保存された領域としては、例えば、アミノ酸16、42、46、48、50、52、59、60、63、67-68、75、82、89、92-93、107-109、116、118、122、134、136、138、140、143、145、152、164-167、170、172-173、187、191、194、198、210、217、223、242および310が挙げられる。さらに、「保存的変異」の節において定義されるような保存的アミノ酸置換を有する領域もまた存在する。「保存的アミノ酸置換」によって、類似の側鎖を有するアミノ酸が意味される。このような置換は、例えば、アミノ酸14、25、38、65、71、79、84、106、112、114、119、123-124、127-128、142、148-149、161、163、171、202、212、217、221-223、264、266、278、283-284、291、305および335に見い出される。

#### 【0022】

B L A Aポリペプチドは、親水性領域および疎水性領域を含む。図5に示されるように、配列番号6のポリペプチドは、親水性領域および疎水性領域の両方を含む。疎水性領域は、およそアミノ酸1~およそアミノ酸75；およそアミノ酸110~およそアミノ酸150；およそアミノ酸200~およそアミノ酸225；およそアミノ酸250~およそアミノ酸290；およそアミノ酸310~およそアミノ酸380；およそアミノ酸420~およそアミノ酸440；およびおよそアミノ酸460~およそアミノ酸500が挙げられる。反対に、疎水性領域としては、およそアミノ酸75~およそアミノ酸110；およそアミノ酸150~およそアミノ酸200；およそアミノ酸225~およそアミノ酸250；およそアミノ酸290~およそアミノ酸310；およそアミノ酸380~およそアミノ

酸420；およそアミノ酸440～およそアミノ酸534が挙げられる。従って、これらの領域は、エピトープの設計および抗原の選択に有用である。

【0023】

表示を簡単にするために、本発明の新規ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、BLAA（Bリンパ球活性化抗原）として総称する。本発明のBLAA核酸およびポリペプチド配列の要約を、表1に提供する。

【0024】

【表1】

表1：配列および対応する配列番号

配列番号	説明
配列番号1	2691ヌクレオチドのヒトcDNA配列
配列番号2	配列番号1のヌクレオチド111～1130（配列番号7）にコードされる340アミノ酸のポリペプチド
配列番号3	2885ヌクレオチドのヒトcDNA配列
配列番号4	配列番号3のヌクレオチド2～1324（配列番号9）にコードされる441アミノ酸のポリペプチド
配列番号5	2229ヌクレオチドのヒトcDNA配列
配列番号6	配列番号5のヌクレオチド60～1661（配列番号11）にコードされる534アミノ酸のポリペプチド
配列番号7	配列番号1のヌクレオチド110～1130にわたるオープンリーディングフレーム
配列番号8	配列番号1のヌクレオチド1130～2691にわたる3'非翻訳領域（「NTR」）
配列番号9	配列番号3のヌクレオチド2～1324にわたるオープンリーディングフレーム
配列番号10	配列番号3のヌクレオチド1325～2885にわたる3'NTR
配列番号11	配列番号5のヌクレオチド60～1661にわたるオープンリーディングフレーム
配列番号12	配列番号7のヌクレオチド1662～2229にわたる3'NTR

本明細書中で使用される場合、「同一性」残基は、2つの配列のアライメントにおける対応するヌクレオチド塩基またはアミノ酸残基が同じ残基である、2つ

の配列間の比較における残基に対応する。残基は、アライメントの2つの配列間の比較が、比較される対応する位置における残基が同じかまたは保存的置換されたアミノ酸（「保存的変異」の節で以下に定義されるような）であることを示す場合には、「類似」である。

#### 【0025】

（核酸）

本発明の1つの局面は、BLAAポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分をコードする、単離されたBLAA核酸分子に関する。BLAA核酸分子はまた、BLAAコード核酸（例えば、BLAA 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使用に十分な核酸フラグメント、およびBLAA核酸分子の増幅または変異のためのPCRプライマーとしての使用のためのフラグメントを含む。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生成されたDNAまたはRNAのアナログ、ならびにこれらの誘導体、フラグメントおよびホモログを含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは、二本鎖DNAである。

#### 【0026】

「プローブ」とは、可変の長さの核酸配列をいい、好ましくは、使用に依存して、少なくとも約10ヌクレオチド(nt)、100nt、または例えば、約6,000ntの間である。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。より長いプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され、非常に特異的であり、そしてオリゴマーよりもはるかに遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてPCR、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計される。

#### 【0027】

「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されているものである。好ましくは、「単離された」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)を含まない。例えば、種々の実施形態で、単離されたBLAA核酸分子は、約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kbまたは0.1kb未満の、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核酸配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技法により產生されるとき、その他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成されるとき、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

#### 【0028】

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7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12からなる群より選択されるヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の相補体を有する核酸分子は、標準的な分子生物学的技法および本明細書で提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11または12の核酸配列の全てもしくは一部分を使用して、BLAA分子は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクローニング技法(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)を用いて単離され得る。

#### 【0029】

本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技法に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され、そしてDNA配列分析により特徴付けられ得る。さらに、BL

A Aヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技法、例えば、自動化DNA合成機を用いることにより調製され得る。

#### 【0030】

本明細書で用いられる用語「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反応で用いられ得る十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的なDNAまたはRNAを増幅し、確認し、もしくはその存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50nt、または100ヌクレオチドの長さ、好ましくは約15ヌクレオチド~30ヌクレオチドの長さを有する核酸配列の部分を含む。1つの実施形態では、100ヌクレオチドより少ない長さ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、3、5、7、8、9、10、11または12の少なくとも6個連続するヌクレオチド、またはその相補物を含み得る。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そしてプローブとして用いられ得る。

#### 【0031】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含む。配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、または12に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、または12に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、または12に示されるヌクレオチド配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する。

#### 【0032】

本明細書で用いられる用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-CrickまたはHoogsteen塩基対形成をいい、そして用語「

結合」は、2つのポリペプチドまたは化合物または関連ポリペプチドまたは化合物またはその組合せ間の物理的または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス性、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は直接的であるかまたは間接的であり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物を介するか、またはその効果に起因し得る。直接的結合は、別のポリペプチドもしくは化合物を介して、またはその効果に起因して生じない、その他の実質的な化学的中間体がない相互作用をいう。

#### 【0033】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12の核酸配列の一部のみ（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BLAAの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）を含み得る。

#### 【0034】

本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の（連続する）核酸配列または少なくとも4個の（連続する）アミノ酸配列（それぞれ、核酸の場合には、特異的なハイブリダイゼーションを可能にし、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに十分な長さ）として規定され、そして全長配列未満のせいぜいいくらかの部分である。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する部分に由来し得る。誘導体は、直接的にかまたは改変もしくは部分的置換によってかのいずれかでネイティブな化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、ネイティブな化合物に類似する構造を有する（しかし、同一ではない）が、特定の成分または側鎖に関してそれとは異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成物であり得るか、または進化的に異なる起源に由来し得、そして野生型と比較して、類似の代謝活性または反対の代謝活性を有し得る。相同体は、異なった種に由来する特定の遺伝子の核酸配列またはアミノ酸配列である。

#### 【0035】

誘導体およびアナログは、以下に記載のように、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、または全長以外のものであり得

る。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は、種々の実施形態において、本発明の核酸もしくはタンパク質に、同一の大きさの核酸またはアミノ酸配列にわたって、または整列した配列に比較した場合（この整列は、当該分野で公知であるコンピューター相同性プログラムによって実施される）、少なくとも約30%、50%、70%、80%、もしくは95%の同一性（好ましい同一性は、80~95%）で実質的に相同であるか、あるいはそのコードする核酸がストリンジェントの、中程度にストリンジェントの、または低いストリンジェントの条件下で上記のタンパク質をコードする配列の相補体にハイブリダイズし得る、領域を含む分子を包含するが、これらに限定されない。例えば、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。

#### 【0036】

「相同な核酸配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」、またはその改変体とは、上記で考察したように、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同なヌクレオチド配列は、BLAAポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。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、同一の生物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（哺乳動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のBLAAポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌクレオチド配列はまた、天然に存在する対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同的ヌクレオチド配列は、ヒトBLAAタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。相同核酸配列は、配列番号2、配列番号4、または配列番号6の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）、およびBLAA活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。BLAAタンパク質の生物学的活性は以下に記載さ

れている。相同的アミノ酸配列は、ヒトBLAAポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

【0037】

BLAAポリペプチドは、本明細書中に記載されるように、BLAA核酸のオープンリーディングフレーム(「ORF」)によってコードされ得る。例えば、本発明は、本発明のORFを含む配列番号7、配列番号9、および配列番号11の核酸配列のストレッチを含み、そして、配列番号2、配列番号4および配列番号6のポリペプチドをそれぞれコードする核酸配列を含む。

【0038】

「オープンリーディングフレーム」(「ORF」)は、ポリペプチドに潜在的に翻訳され得るヌクレオチド配列に対応する。ORFを含む核酸のストレッチは、終止コドンによって、妨げられない。全体のタンパク質についてのコード配列を示すORFは、ATG「開始」コドンを用いて始まり、そして、3つの「終止」コドン(すなわち、TAA、TAG、またはTGA)で終止する。本発明の目的について、ORFは、開始コドン、終止コドン、または両方を有するかまたは有さない、コード配列の任意の部分であり得る。本物の細胞性タンパク質をコードする良好な候補として考えられるORFについては、最小のサイズの要求がしばしば設定され、例えば、50アミノ酸以上のタンパク質をコードするDNAのストレッチが、設定される。

【0039】

1つの実施形態において、1020塩基対(bp)ORF(配列番号7)は、配列番号1のヌクレオチド111からヌクレオチド1130を含む。このORFは、配列番号2に従う340アミノ酸ポリペプチドへ翻訳され得る。別の実施形態では、1323bp ORF(配列番号9)は、配列番号3のヌクレオチド2からヌクレオチド1324を含む。このORFは、配列番号4に従う441アミノ酸ポリペプチドへと翻訳され得る。別の実施形態では、1601bp ORF(配列番号11)は、配列番号5のヌクレオチド60からヌクレオチド1661を含む。このORFは、配列番号6に従って、534アミノ酸ポリペプチドへと翻訳され得る。

## 【0040】

ヒトBLAA遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるBLAAホモログ、ならびに他の哺乳動物由来のBLAAホモログを同定および/またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/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、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12の天然に存在する変異体の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列に、ストリンジェントな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。

## 【0041】

ヒトBLAAヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じ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、プローブに付着した標識基を含み、例えば、この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、BLAAタンパク質を誤って発現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、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のBLAAをコードする核酸のレベルを測定すること（例えば、BLAA mRNAレベルを検出すること、またはゲノムBLAA遺伝子の変異しているかまたは欠失しているか否かを決定すること）によって使用され得る。

## 【0042】

「BLAAの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、本発明のポリ

ペプチドの活性に類似するが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。「BLAA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、BLAAの生物学的活性（BLAA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、3、5、7、9、もしくは11の一部を単離し、BLAAポリペプチドのコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてBLAAのコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。

#### 【0043】

（BLAAの改変体）

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1、3、5、7、9、もしくは11に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。それにより、これらの核酸は、配列番号1、3、5、7、9、もしくは11に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じBLAA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、配列番号2、配列番号4、または配列番号6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。

#### 【0044】

配列番号1、3、5、7、9、もしくは11に示されるヒトBLAAヌクレオチド配列に加えて、BLAAのアミノ酸配列における変化を導くDNA配列多型は、集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることが、当業者によって理解される。BLAA遺伝子中の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、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、BLAAポリペプチド、好ましくは哺乳動物のBLAAポリペプチド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のバリエーションは、代表的には、BLAA遺伝子のヌクレオチド配列において1～5%の変動性を生じ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてBLAAの機能的活性を変化させない、BLAA内の任意および全てのこのようなヌクレオチドのバ

リエーションならびに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であると意図される。

【0045】

さらに、他の種由来のBLAAタンパク質をコードし、従って、配列番号1、3、5、7、9、もしくは11のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明のBLAAの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、本明細書中に開示されるヒトBLAA核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的な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ヒトcDNAまたはその一部を用いて単離され得る。例えば、可溶性ヒトBLAA cDNAは、ヒトの膜結合BLAAに対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜結合ヒトBLAA cDNAは、可溶性ヒトBLAAに対するその相同性に基づいて単離され得る。

【0046】

従って、別の実施形態では、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、そしてストリンジェント条件下で配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも10、25、50、100、250、500、1000、1500、2000、またはそれを超えるヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域（例えば、配列番号1、3、5、7、9、または11）にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が代表的には互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

【0047】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のBLAAポリペプチドをコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（paralogs））は、特定

のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

【0048】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融解点( $T_m$ )より約5%低いように選択される。この $T_m$ は、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする(規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下)温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、 $T_m$ では、50%のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオンより少なく、代表的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン(またはその他の塩)、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10nt~50nt)について少なくとも約30%、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少なくとも約60%であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

【0049】

ストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そしてAmusubelら(編)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99%相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェント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変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中での65℃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に、0.2×SSC、0.01% BSA中での50℃での1回以上の洗浄が続く。ストリンジェント条件下で配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12の配列に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。

#### 【0050】

第2の実施形態では、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジェンシー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中でのハイブリダイゼーション、続いて1×SSC、0.1% SDS中での37℃での1回以上の洗浄である。用いられ得る中程度の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、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYおよびKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照のこと。

#### 【0051】

第3の実施形態では、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的

な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll 1、0.2% BSA、100 mg/mlの変性サケ精子DNA、10% (重量/容量) デキストラン硫酸中での40 でのハイブリダイゼーション、続いて2×SSC、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTAおよび0.1% SDS中での50 での1回以上の洗浄である。用いら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、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように)。例えば、Ausubelら (編)、1993、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYならびに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。

#### 【0052】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、BLAA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、3、5、7、9、もしくは11のヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、BLAAポリペプチドの機能的能力を変更することなく、コードされるBLAAポリペプチドのアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号1、3、5、7、9、もしくは11の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を有意に変更することなく、BLAAの野生型配列から、変更され得る残基であり、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BLAAポリペプチドの間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される (例えば、図4および上記考察を参照のこと)。

#### 【0053】

さらに、図4に示されているアライメントによって示されるように、そして、上記のように、本発明のBLAAポリペプチドのファミリーメンバーの間で保存されているアミノ酸残基はまた、特に変更を受け入れ難いと推定されている。しかし、他のアミノ酸残基(例えば、BLAAポリペプチドのメンバーの間で、保存されていないかまたは半分のみ保存されている残基)は、活性について必須でないかもしれないし、従って、変更を受け入れ易い。

#### 【0054】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、BLAAポリペプチドをコードする核酸分子に関する。このようなBLAAポリペプチドは、アミノ酸配列が、配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6とは異なるが、生物学的活性をなお保持する。1つの実施形態では、単離された核酸分子は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このポリペプチドは、それぞれ、配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6のアミノ酸配列に少なくとも約45%の相同性であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸分子によってコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6に少なくとも約60%相同性であり、より好ましくは配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6に少なくとも約70%相同性であり、なおさらに好ましくは配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6に少なくとも約80%相同性であり、なおさらに好ましくは配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6に少なくとも約90%相同性であり、そして最も好ましくは配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6に少なくとも約95%相同性である。

#### 【0055】

配列番号2、配列番号4、または配列番号6のポリペプチドに相同なBLAAタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、もしくは11のヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を導入することにより作製され得、その結果、1以上のアミノ酸の置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。

#### 【0056】

変異は、標準技術(例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発)

によって配列番号1、3、5、7、9、もしくは11のヌクレオチド配列に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「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、アミノ酸置換である。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、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（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）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（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）。従って、BLAA中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、BLAAコード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、BLAAの生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号1、3、5、7、9、もしくは11の変異誘発に続いて、コードされるポリペプチドは、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、そしてこのポリペプチドの活性が決定され得る。

#### 【0057】

1つの実施形態では、変異BLAAポリペプチドは、以下についてアッセイされ得る：（1）他のBLAAポリペプチド、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、（2）変異BLAAポリペプチドと、BLAAリガンド（例えば、CTLA4）との間の複合体形成；（3）変異BLAAポリペプチドが細胞内標的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能力（例えば、アビジンタンパ

ク質)。

#### 【0058】

なお別の実施形態では、BLAA変異体は、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー活性を示す能力(例えば、(i)BLAAポリペプチドと活性化Tリンパ級との間の複合体形成；(ii)ヒトB細胞活性化抗原B7ファミリータンパク質に有意な相同性を有するタンパク質とのBLAAの相互作用；(iii)ヒトBリンパ球活性化抗原B7ファミリータンパク質とのBLAAポリペプチドの相互作用；ならびに(iv)他のタンパク質とのBLAAポリペプチドの相互作用)についてアッセイされ得る。さらに別の実施形態では、BLAA活性は、少なくとも1つ以上の以下の活性を有する。(i)免疫グロブリンスーパーファミリー関連タンパク質活性の調節；(ii)Tリンパ球増殖の調節；ならびに(iii)Tリンパ球活性化の調節。

#### 【0059】

(アンチセンス)

本発明の別の局面は、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12またはそのフラグメント、アナログもしく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し得る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」核酸に相補的である(例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である)ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約10、約25、約50、約100、約250もしくは約500ヌクレオチドまたは全体のBLAAコード鎖、またはそれらの一部のみに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、もしくは配列番号6のBLAAポリペプチドのフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、もしくは12のBLAAの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。

#### 【0060】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、BLAA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」とは、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をいう（例えば、配列番号1（配列番号7）のヌクレオチド111～1130）、配列番号3（配列番号9）のヌクレオチド2～1324、または配列番号5（配列番号11）のヌクレオチド60～1601に対応するヒトBLAAのコード領域）。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、BLAA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」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない、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'非翻訳領域ともいわれる）。例、すなわち「非コード領域」としては、配列番号8、配列番号10、および配列番号12の非翻訳領域（「NTR」）を含む。

#### 【0061】

本明細書中に開示されるBLAAをコードするコード鎖配列（例えば、配列番号5、配列番号7もしくは配列番号9）を考慮すれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickまたはHoogsteenの塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、BLAA mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、BLAA mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみ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、BLAA mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さが約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。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、またはこの分子の生物学的安定性を増大させるように、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る二重鎖の物理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用いて化学的に合成され得る（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る）。

## 【0062】

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変された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 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)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、 $\beta$  - D - ガラクトシルクエオシン (galactosylqueosine)、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、 $\beta$  - D - マンノシルクエオシン (mannosylqueosine)、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)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン (queosine)、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、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る (すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下のサブセクションにさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である)。

## 【0063】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果それらは、BLAAポリペプチドをコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば転写および/また

は翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんのメジャーグループ (major groove) における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。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ように改変され得、次いで全身に投与される。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。これは、例えば、その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る。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。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 pol II プロモーターまたは pol III プロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、好ましい。

#### 【0064】

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、a - アノマー核酸分子である。a - アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここで、通常の - ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する (Gaultierら (1987) *Nucleic Acids Res* 15: 6625 ~ 6641)。この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) を含む得る。

#### 【0065】

(リボザイムおよびPNA部分)

核酸改変としては、非限定的な例として、改変塩基、およびその糖ホスフェート骨格が改変または誘導体化された核酸が挙げられる。これらの改変は、少なく

ともある部分、改変核酸の化学安定性を増強するために実行され、その結果、これらは、例えば、本治療適用においてアンチセンス結合核酸として使用され得る。

#### 【0066】

1つ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、一本鎖核酸（例えば、mRNA）を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子であり、これらは、その一本鎖核酸に対して相補領域を有する。従って、リボザイム（例えば、ハンマーヘッドリボザイム（HaselhoffおよびGerlach（1988）Nature 334:585~591に記載される））を使用して、BLAA mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってBLAA mRNAの翻訳を阻害し得る。BLAAをコードする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BLAA cDNAのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号1、3、5、7、9もしくは11）に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、BLAAをコードするmRNA内で切断されるヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体が構築され得る。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、BLAA mRNAを使用して、RNA分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、Bartelら（1993）Science 261:1411~1418を参照のこと。

#### 【0067】

あるいは、BLAA遺伝子発現は、BLAAの調節領域（例えば、BLAAのプロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的化し、標的細胞中でBLAA遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。一般には、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。

## 【0068】

種々の実施形態において、BLAAの核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、その分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変して、ペプチド核酸を生成し得る(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用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換され、そして4つの天然の核塩基(nucleobase)のみが保持されている核酸模倣物(例えば、DNA模倣物)をいう。PNAの中性の骨格は、低いイオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、上記のHyrupら(1996); Perry-O'Keefeら(1996) PNAS 93:14670~675において記載されるような標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いて行われ得る。

## 【0069】

BLAAのPNAは、治療的適用および診断的適用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の停止を誘導することまたは複製を阻害することによる、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子剤として使用され得る。例えば、BLAAのPNAはまた、例えばPNA指向性PCRクランピングによる遺伝子における一塩基対変異の分析において;他の酵素(例えば、S1ヌクレアーゼ)と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素として(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もしくはプライマーとして(Hyrupら(1996)上記; Perry-O'Keefe(1996)、上記)、使用され得る。

## 【0070】

別の実施形態において、BLAAのPNAは、例えば、それらの安定性または細胞性取り込みを増強するために、PNAに脂溶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、またはリポソーム

もしくは当該分野において公知の薬物送達の他の技術の使用によって改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組合せ得る、BLAAのPNA-DNAキメラが生成され得る。PNA部分が高い結合親和性および特異性を提供する一方で、そのようなキメラは、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。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、核塩基間の結合数および方向を考慮して選択される適切な長さのリンカーを使用して連結され得る(Hyrup(1996)上記)。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup(1996)上記およびFinnら(1996)Nucl Acids Res 24:3357~63において記載されるように行われ得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学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-チミジンホスホラミダイト)が、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)。次いで、PNAモノマーが段階様式でカップリングされ、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する(Finnら(1996)上記)。あるいは、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを用いてキメラ分子が合成され得る。Peterse nら(1975)Bioorg Med Chem Lett 5:1119~11124を参照のこと。

#### 【0071】

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属の基を含み得る：ペプチド(例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するため)、または細胞膜を横切る輸送を容易にする因子(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WO88/09810を参照のこと)、または血液脳関門(例えば、PCT公開番号WO89/10134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誘

発切断剤（例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6：958～976を参照のこと）、またはインターカレーター剤（例えば、Zon, 1988、Pharm. Res. 5：539～549を参照のこと）で改変され得る。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誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤など）に結合され得る。

#### 【0072】

（BLAAポリペプチド）

本明細書中に使用される場合、用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、交換可能であることが意図される。本発明の新規ポリペプチドは、配列が配列番号2、配列番号4、または配列番号6に提供されるBLAAポリペプチドが挙げられる。本発明はまた、任意の残基が、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に示される対応する残基から変更されるがそのBLAA活性および生理学的機能が維持されるポリペプチドまたはその機能的フラグメントはまだコードし得る、変異ポリペプチドまたは改変ポリペプチドを含む。変異タンパク質または改変タンパク質において、20%まで、または20%より上の残基が、このように変更され得る。

#### 【0073】

一般的に、BLAA様機能を保存するBLAA改変体は、配列中の特定の位置における残基が他のアミノ酸によって置換された任意の改変体を含み、そしてさらに、親タンパク質の2つの残基間にさらなる残基を挿入する可能性ならびに親配列から1つ以上の残基を欠失する可能性を含む。任意のアミノ酸置換、挿入、または欠失が、本発明によって含まれる。好ましい状況において、置換は、上記に規定されるように保存的置換である。

#### 【0074】

本発明の1つの局面は、単離されたBLAAポリペプチドおよびその生物学的に活性な部分、あるいはその誘導體、フラグメント、アナログまたはホモログに関する。抗BLAA抗体を惹起するための免疫原としての使用に適したポリペプチドフラグメントがまた提供される。1つの実施形態において、ネイティブなB

L A Aポリペプチドは、標準的な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、B L A Aポリペプチドは、組換えDNA技術によって産生される。組換え発現の代わりに、B L A Aタンパク質またはB L A Aポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を用いて化学合成され得る。

#### 【0075】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分は、B L A Aポリペプチドの由来する細胞または組織供給源由来の細胞性物質または他の夾雑タンパク質もしくは夾雑ポリペプチドを実質的に含まないか、あるいは化学合成される場合に化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、B L A Aタンパク質が単離または組換え産生される細胞の細胞性成分から、B L A Aタンパク質が分離されている、B L A A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「細胞性物質を実質的に含まない」は、非B L A Aタンパク質（本明細書中において「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは非B L A Aタンパク質を約20%未満、なおより好ましくは非B L A Aタンパク質を約10%未満、そして最も好ましくは非B L A Aタンパク質を約5%未満有する、B L A Aポリペプチドの調製物を含む。B L A Aポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合、これはまた、好ましくは、培養培地を実質的に含まない。すなわち、培養培地は、そのタンパク質調製物の容量の約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%未満を示す。

#### 【0076】

用語「化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、B L A Aポリペプチドがそのポリペプチドの合成に關与する化学物質前駆体または他の化学物質から分離されている、B L A Aポリペプチドの調製物を含む。1つの実施形態において、用語「化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、化学物質前駆体または非B L A A化学物質を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは化学物質前駆体または非B L A A化学物質を約20%未満、な

および好ましくは化学物質前駆体または非B L A A化学物質を約10%未満、そして最も好ましくは化学物質前駆体または非B L A A化学物質を約5%未満有する、B L A Aポリペプチドの調製物を含む。

【0077】

B L A Aポリペプチドの生物学的に活性な部分は、全長B L A Aポリペプチドより少ないアミノ酸を含み、そしてB L A Aポリペプチドの少なくとも1つの活性を示す、B L A Aポリペプチドのアミノ酸配列（例えば、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に示されるアミノ酸配列）に十分に相同なアミノ酸配列、またはB L A Aポリペプチドのアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、B L A Aポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。B L A Aタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、長さが10アミノ酸以上、25アミノ酸以上、50アミノ酸以上、100アミノ酸以上であるポリペプチドであり得る。

【0078】

配列番号2に開示されるポリペプチドは、2つのI g様ドメイン、続いて膜貫通ドメインおよび44アミノ酸の細胞質ドメインを有する。配列番号4に開示されるポリペプチドは、3つのI g様ドメイン、続いて膜貫通ドメインおよび44アミノ酸の細胞質ドメインを有する。配列番号6に開示されるポリペプチドは、4つのI g様ドメイン、続いて膜貫通ドメインおよび44アミノ酸の細胞質ドメインを有する。その疎水性プロット分析が、図5に示される。

【0079】

1つの実施形態において、B L A Aポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6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、B L A Aポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に実質的に相同であり、そして以下に詳細に議論されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるが配列番号2、配列番号4、または配列番号6のポリペプチドの機能的活性を保持する。従って、別の実施形態において、B L A Aポリペプチドは、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、または配列番号6のBLAAポリペプチドの機能的活性を保持する、ポリペプチドである。

#### 【0080】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の相同性の百分率を決定するために、配列は、至適な比較の目的のために整列される(例えば、ギャップが、第2のアミノ酸配列または核酸配列との最適な整列のために、第1のアミノ酸配列または核酸配列の配列中に導入され得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、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)。

#### 【0081】

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、当該分野において公知のコンピュータープログラム(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)を用いて決定され得る。NeedlemanおよびWunsch 1970 J Mol Biol 48:443~453を参照のこと。核酸配列比較のための以下の設定(GAP作製ペナルティー、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すると、上記で言及される類似の核酸配列のコード領域は、配列番号1、3、5、7、9または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%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性の程度を示す。

#### 【0082】

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、特定の比較領域にわたって、残基毎を基準として同一である程度をいう。用

語「配列同一性のパーセンテージ」は、以下により算出される：この比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合にはA、T、C、G、U、またはI）が存在する位置の数を決定して一致した位置の数を得ること、この一致した位置の数を、比較領域の内の位置の総数（すなわち、ウインドウサイズ）で除算すること、およびその結果を100で乗算して、配列同一性のパーセンテージを得ること。用語「実質的な同一性」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、ここでこのポリヌクレオチドは、比較領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性、そして頻繁には90～95%の配列同一性、より通常には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。

#### 【0083】

（キメラタンパク質および融合タンパク質）

本発明はまた、BLAA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、BLAA「キメラタンパク質」またはBLAA「融合タンパク質」は、非BLAAポリペプチドに作動可能に連結された、BLAAポリペプチドを含む。「BLAAポリペプチド」は、BLAA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BLAAポリペプチド」は、BLAAタンパク質に対して実質的に相同ではないタンパク質（例えば、BLAAポリペプチドとは異なり、かつ同一の生物または異なる生物に由来する、タンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。BLAA融合タンパク質において、このBLAAポリペプチドは、BLAAタンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。1つの実施形態では、BLAA融合タンパク質は、BLAA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含む。別の実施形態では、BLAA融合タンパク質は、BLAAポリペプチドの少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。なお別の実施形態において、BLAA融合タンパク質は、BLAAポリペプチドの少なくとも3つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、BLAAポリペプチドおよび非BLAAポリペプチドが、インフレームで互いに融合されているこ

とを示すことが意図される。非BLAAポリペプチドは、BLAAポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0084】

このような融合タンパク質は、BLAA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でさらに利用され得る（このようなアッセイは、以下に詳細に記載される）。

【0085】

1つの実施形態においては、この融合タンパク質は、GST-BLAA融合タンパク質であり、この融合タンパク質では、BLAA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末端に融合されている。このような融合タンパク質は、組換えBLAAの精製を容易にし得る。

【0086】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含む、BLAAポリペプチドである。例えば、天然のBLAAシグナル配列（例えば、配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸およそ1~26）が、除去され得かつ別のタンパク質由来のシグナル配列で置換され得る。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、BLAAの発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用を介して増加され得る。

【0087】

なお別の実施形態においては、この融合タンパク質は、BLAA-免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここでは、BLAA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に由来する配列に融合されている。本発明のこのBLAA-免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でBLAAリガントとBLAAタンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボでBLAA媒介シグナル伝達を抑制し得る。1つの非限定的な例においては、意図される本発明のBLAAリガントは、BLAAレセプターである。このBLAA-免疫グロブリン融合タンパク質を用い、BLAA同族リガントのバイオアベイラビリティに影響を与え得る。BLAAリガント/BLAA相互作用の阻害は、免疫応答関連障害の両方の

処置に治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのBLAA-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗BLAA抗体を産生するための免疫原として、BLAAリガンドを精製するため、そしてBLAAリガンドとのBLAAの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで、用いられ得る。

#### 【0088】

本発明のBLAAキメラタンパク質またはBLAA融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着(stagger)末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切に粘着(cohesive)末端の充填(fill-in)、所望しない連結を避け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ことにより、インフレームで一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅を、キメラ遺伝子配列を生成するために次いでアニールおよび再増幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて実施し得る(例えば、Ausbelら(編)CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと)。さらに、融合成分(例えば、GSTポリペプチド)をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。BLAAをコードする核酸は、この融合成分がBLAAポリペプチドにインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

#### 【0089】

(BLAAアゴニストおよびBLAAアンタゴニスト)

本発明はまた、BLAAアゴニスト(模倣物)またはBLAAアンタゴニストのいずれかとして機能するBLAAポリペプチドの改変体に関する。BLAAポリペプチドの改変体は、変異誘発(例えば、BLAAタンパク質の別個の点変異または短縮)により生成され得る。BLAAポリペプチドのアゴニストは、BLAAポリペプチドの天然に存在する形態と実質的に同じ生物学的活性、またはそ

の生物学的活性のサブセットを保持し得る。B L A A タンパク質のアンタゴニストは、B L A A ポリペプチドの天然に存在する形態の1つ以上の活性を、例えば、B L A A ポリペプチドを含む細胞シグナル伝達カスケードの下流メンバーまたは上流メンバーに競合的に結合することにより、阻害し得る。従って、特定の生物学的効果が、限られた機能の改変体を用いた処理により惹起され得る。1つの実施形態では、このポリペプチドの天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、B L A A ポリペプチドの天然に存在する形態を用いた処置に対して被験体におけるより少ない副作用を有する。

#### 【0090】

B L A A アゴニスト（模倣物）として、またはB L A A アンタゴニストのいずれかとして機能するB L A A ポリペプチドの改変体は、B L A A ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニスト活性のための、B L A A ポリペプチドの変異体（例えば、短縮型変異体）のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。1つの実施形態では、B L A A 改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。B L A A 改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なB L A A 配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にB L A A 配列のセットを含む（例えば、ファージディスプレイのための）より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、遺伝子配列に酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なB L A A 改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なB L A A 配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で公知である（例えば、Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraら (1984) Annu Rev Biochem 53:323; Itakuraら (1984) Science 198:1056; Ik

ら(1983) *Nucl Acid Res* 11:477を参照のこと)。

【0091】

(ポリペプチドライブラリー)

さらに、BLAAタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、BLAAポリペプチドの改変体のスクリーニングおよび引き続き選択のためのBLAAポリペプチドの多彩な集団を生成し得る。1つの実施形態では、コード配列フラグメントのライブラリーは、BLAAコード配列の二本鎖PCRフラグメントを、1分子あたり約1つのみのニックが生じる条件下、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成するためにこのDNAを再生すること、S1ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成し得る。この方法により、BLAAポリペプチドの種々のサイズのN末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが派生し得る。

【0092】

点変異または短縮により作成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、選択された性質を有する遺伝子産物の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法が当該分野で公知である。このような技法を、BLAAポリペプチドのコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、およびこのコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出が、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発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセブル変異誘発(REM)を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、BLAA改変体を同定し得る(Arkinおよび

Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrava et al. (1993) Protein Engineering 6:327-331)。

【0093】

(抗BLAA抗体)

本発明は、抗体および抗体フラグメント(例えば、 $F_{ab}$ または $(F_{ab})_2$ )を包含し、これは、本発明の任意のポリペプチドに免疫特異的に結合する。

【0094】

単離されたBLAAポリペプチドまたはその一部もしくはフラグメントは、免疫原として使用され、ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体の調製のための標準的な技術を用いて、BLAAを結合する抗体を生成し得る。全長BLAAポリペプチドが使用され得るか、あるいは本発明は、免疫原として使用するためのBLAAの抗原性ペプチドフラグメントを提供する。BLAAの抗原性ペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6において示されるアミノ酸配列の少なくとも4個のアミノ酸残基を含み、かつBLAAのエピトープを含み、その結果、このペプチドに対して惹起された抗体が、BLAAと特異的免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも6、8、10、15、20または30アミノ酸残基、を含む。より大きい抗原性ペプチドが、使用に依存して、および当業者に周知の方法に従って、短い抗原性ペプチドよりときどき好まれる。

【0095】

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1つのエピトープは、ポリペプチドの表面上に位置するBLAA関連タンパク質の領域(例えば、親水性領域)である。図5に示される配列番号6のヒトBLAAポリペプチド配列の疎水性分析は、親水性領域が、約アミノ酸75~約アミノ酸110;約アミノ酸150~約アミノ酸200;約アミノ酸225~約アミノ酸250;約アミノ酸290~約アミノ酸310;約アミノ酸380~約アミノ酸420;約アミノ酸440~約アミノ酸534を含むことを示す。これらの領域は、おそらく抗体産生を標的化するために有用である表面残基をコードするよう

である。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換とともにまたはなしのいずれかで、Kyte DoolittleまたはHopp Woods法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成され得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として援用される、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を参照のこと。

#### 【0096】

本願明細書において開示されるように、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のBLAAポリペプチド配列、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログは、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生成において、免疫原として利用され得る。本願明細書において用いられる場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン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（これと免疫反応する）抗原結合部位を含む分子）（例えばBLAA）をいう。このような抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、 $F_{ab}$ および $F_{(ab)2}$ フラグメント、ならびに $F_{ab}$ 発現ライブラリーが挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態において、ヒトBLAAポリペプチドに対する抗体が、開示される。当該分野で公知の種々の手順が、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のBLAAポリペプチド配列、あるいはそれらの誘導体、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生産のために用いられ得る。

#### 【0097】

ポリクローナル抗体の生成のため、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）がネイティブなポリペプチドもしくはその合成改変体、またはそれらの誘導体を用いる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、組換え的に発現されたBLAAポリペプチド、または化学的に合成されたBLAAポリペプチドを含み得る。調製物は、アジュバン

トをさらに含み得る。免疫学的応答を増加するために用いら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（完全および不完全）アジュバント、鉍物ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノール、など）、ヒトアジュバント（例えば、Bacille Calmette - GuerinおよびCorynebacterium parvum）または類似した免疫刺激因子。所望の場合、BLAAに対する抗体分子が、哺乳動物（例えば、血液から）単離され得、そしてさらに、プロテインAクロマトグラフィーのような周知の技術によって精製され、IgG画分を入手し得る。

#### 【0098】

本願明細書において用いられる場合、用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」とは、BLAAの特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の1つの種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的には、特に、それが免疫反応する特定のBLAAポリペプチドに対して、単一の結合親和性を示す。特にBLAAポリペプチド、またはその誘導體、フラグメント、アナログ、もしくはホモログに対するモノクローナル抗体の調製のために、連続的細胞株培養により抗体分子の生成を提供する任意の技術が利用され得る。このような技術としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：ハイブリドーマ技術（KohlerおよびMilstein、1975 Nature 256：495～497を参照のこと）；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を参照のこと）およびヒトモノクローナル抗体を生産するEBVハイブリドーマ技術（Coleら、1985 MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss, Inc., 77～96頁を参照のこと）。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実行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（Coteら、1983 Proc Natl Acad Sci USA 80：2026～2030を参照のこと）、またはエプスタインバーウイルスを

用いるインビトロでのヒトB細胞の形質転換(Coleら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss, Inc., 77~96頁を参照のこと)によって生成され得る。上記引用の各々が、その全体において本明細書中で参考として援用される。

【0099】

本発明に従って、BLAAポリペプチドに特異的な単鎖抗体の生成のために、技術は適応され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、方法は、 $F_{ab}$ 発現ライブラリーの構築に適応され(例えば、Huseら、1989 Science 246:1275~1281を参照のこと)、BLAAポリペプチド、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対して所望の特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効果的同定を可能にする。非ヒト抗体は、当該分野で周知の技術により「ヒト化」され得る。例えば、米国特許第5,225,539号を参照のこと。BLAAポリペプチドに対するイディオタイプを含む抗体フラグメントは、以下を含むがこれに限定されない当該分野で公知の技術により生成され得る：(i)抗体分子のペプシン消化によって生産される $F_{(ab')_2}$ 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じる $F_{ab}$ フラグメント；(iii)パパイニンおよび還元剤での抗体分子の処理によって生じる $F_{ab}$ フラグメント、ならびに(iv) $F_v$ フラグメント。

【0100】

さらに、ヒトおよび非ヒト部分の両方を含むキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体のような、組換え抗BLAA(これらは、標準組換えDNA技術を用いて作製され得る)は、本発明の範囲内である。このようなキメラ抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術により生成され得る。この技術は例えば、以下に記載の方法を用いる：PCT国際出願番号PCT/US86/02269；欧州特許出願番号184,187号；欧州特許出願番号171,496；欧州特許出願番号173,494；PCT国際公開番号WO 86/01533；米国特許第4,816,567号；米国特許第5,22

5, 539号; 欧州特許出願番号125, 023号; Betterら(1988) Science 240:1041~1043; Liuら(1987) PNAS 84:3439~3443; Liuら(1987) J Immunol 139:3521~3526; Sunら(1987) PNAS 84:214~218; Nishimuraら(1987) Cancer Res 47:999~1005; Woodら(1985) Nature 314:446~449; Shawら(1988) J Natl Cancer Inst 80:1553~1559; Morrison(1985) Science 229:1202~1207; Oiら(1986) BioTechniques 4:214; Jonesら(1986) Nature 321:552~525; Verhoeffら(1988) Science 239:1534; ならびに Beidlerら(1988) J Immunol 141:4053~4060。上記引用の各々は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

#### 【0101】

1つの実施形態において、所望の特異性を保有する抗体のスクリーニングのための方法論は、当該分野内で公知の酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)および他の免疫学的に媒介される技術を含むが、これに限定されない。特定の実施形態において、BLAAポリペプチドの特定のドメインに対して特異的である抗体の選抜は、このようなドメインを所有しているBLAAポリペプチドのフラグメントに結合するハイブリドーマの生成により容易にされる。BLAAポリペプチド、またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログ内部のIg様ドメインについて特異的である抗体がまた、本願明細書において提供される。

#### 【0102】

抗-BLAA抗体は、BLAAポリペプチドの局在化および/または定量に関する当該分野で公知の方法において用いられ得る(例えば、適切な生理学的なサンプル内のBLAAポリペプチドのレベルを測定の際の使用のために、診断的方法における使用のために、ポリペプチドの画像化における使用のために、など)。所定の実施形態において、BLAAポリペプチド、またはその誘導體、フラグ

メント、アナログもしくはホモログの抗体（抗体由来の結合ドメインを含む）は、薬理的に活性な化合物〔本明細書中、以降において「治療剤」〕として利用される。

#### 【0103】

抗BLAA抗体（例えば、モノクローナル抗体）は、標準的な技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィまたは免疫沈降）によって、BLAAを単離するために用いられ得る。抗BLAA抗体は、細胞からの天然のBLAA、そして宿主細胞において発現される組換え的に産生されたBLAAの精製を容易にし得る。さらに、抗BLAA抗体が、（例えば、細胞の溶解産物または細胞上清における）BLAAタンパク質を検出するために用いられ、BLAAポリペプチドの発現の量およびパターンを評価し得る。抗BLAA抗体は、例えば、所定の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部として組織におけるタンパク質レベルをモニターするために診断的に用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質に結合させる（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易にされ得る。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン（dichlorotriazinylamine）フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられる；そして、適切な放射性物質の例としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられる。

#### 【0104】

（BLAA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、BLAAのポリペプチド、またはそれらの誘導体、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。本明細書において使用される場合、用語「ベクター」は、それに連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。1つの型のベクターは、「プラスミド」である。これはさらなるDNAセグメントが連結され得る環状の二本鎖DNAループをいう。別の型のベクターは、ウイルス性ベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクターは、ベクターが導入される宿主細胞中で自律複製し得る（例えば、細菌性の複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そして、これにより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、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書において「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用いられる形態のベクターであるので、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、等価の機能を果たす、ウイルス性ベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）のような他の形態の発現ベクターを含むことが意図される。

#### 【0105】

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の本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結される、発現に用いられるべき宿主細胞に基づいて選択される、1つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結する」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロの転写/翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合は、宿主細胞において）ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されるという意味を意図する。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）を含むことを意図

する。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)に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指向する配列(例えば、組織特異的調節配列)を含む。発現ベクターの設計が形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞中に導入され得、それにより、本明細書に記載される核酸により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、BLAAポリペプチド、BLAAの変異形態、融合タンパク質など)を生成し得る。

#### 【0106】

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、BLAA発現のために設計され得る。例えば、BLAAは、細菌細胞(例えば、E. coli)、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを用いる)、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel; GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990)においてさらに議論される。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ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。

#### 【0107】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、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的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有するE. coliにおいて実行される。融合ベクターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的のために役立つ:(1)組換えタンパク質の発現を増大させる

こと；(2)組換えタンパク質の溶解度を増大させること；および(3)アフィニティー精製においてリガンドとして作用することによって、組換えタンパク質の精製を補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解性切断部位が、融合部分の結合部に導入され、そしてこの組換えタンパク質により、融合タンパク質の精製の後に融合部分から組換えタンパク質を分離することが可能になる。このような酵素、およびその同族の認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、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、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合する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.)が挙げられる。

#### 【0108】

適切な誘導性非融合E.coli発現ベクターの例としては、pTrc(Amran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。

#### 【0109】

E.coliにおける組換えタンパク質発現を最大化するための1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現することである。Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY:METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif.(1990)119-128を参照のこと。別の戦略は、各アミノ酸についての個々のコドンが、E.coliにおいて優先的に利用されるコドンであるように発現ベクター中に挿入される核酸の核酸配列を変更する

ことである(Wadaら(1992)Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

#### 【0110】

別の実施形態において、BLAA発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母*S. cerevisiae*における発現の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。

#### 【0111】

あるいは、BLAA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。培養昆虫細胞(例えば、SF9細胞)中でのタンパク質の発現のため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。

#### 【0112】

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。哺乳動物細胞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、一般に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、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方の

ための他の適切な発現系については、例えば、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。

【0113】

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（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）中で優先的に核酸の発現を指向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的なプロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkertら（1987）Genes Dev 1:268-277）、リンパ特異的プロモーター（CalameおよびEaton（1988）Adv Immunol 43:235-275）、特に、T細胞レセプターのプロモーター（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、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle（1989）PNAS 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlundら（1985）Science 230:912-916）、ならびに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第264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる（例えば、マウスホックス（murine hox）プロモーター（KesselおよびGruss（1990）Science 249:374-379）および -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）。

【0114】

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、BLAA mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現を(DNA分子の転写によって)可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型においてアンチセンスRNA分子の連続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結された調節配列(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)が選択され得るか、あるいは、アンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞特異的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、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、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議論については、Weintraubら、「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、Reviews - Trends in Genetics、第1巻(1)1986を参照のこと。

【0115】

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た宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象の細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいうことが理解される。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変が次の世代において生じ得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用されるような用語の範囲内に含まれる。

【0116】

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、BLAAポリペプチドは、細菌細胞(例えば、E. coli)、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)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。

## 【0117】

ベクターDNAは、従来の形質転換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中に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウム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含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、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）および他の実験室マニュアルに見出され得る。

## 【0118】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションのために、用いられる発現ベクターおよびトランスフェクション技法に依存して、細胞の小フラクションのみが外来DNAをそれらのゲノム中に組み込み得ることが知られている。これらの組み込み体を同定および選択するために、一般に、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子が、目的の遺伝子とともに宿主細胞中に導入される。種々の選択可能なマーカーは、G418、ヒグロマイシンおよびメトトレキセートのような薬物に対する耐性を付与するものを含む。選択可能なマーカーをコードする核酸は、BLAAをコードするのと同じベクター上で宿主細胞中に導入され得るか、または別のベクター上で導入され得る。この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、薬物選択により同定され得る（例えば、取り込まれた選択可能なマーカー遺伝子をもつ細胞は生存し、その一方、その他の細胞は死滅する）。

## 【0119】

培養中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞のような、本発明の宿主細胞

胞を用いて、B L A Aポリペプチドを産生（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用いてB L A Aポリペプチドを産生する方法を提供する。1つの実施形態では、この方法は、本発明の宿主細胞（その中にB L A Aをコードする組換え発現ベクターが導入されている）を、適切な培地中で、このB L A Aポリペプチドが産生されるように培養する工程を包含する。別の実施形態では、この方法は、この培地から、または宿主細胞からB L A Aを単離する工程をさらに包含する。

#### 【0120】

（トランスジェニック動物）

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生成するために用いられ得る。例えば、1つの実施形態では、本発明の宿主細胞は、受精卵母細胞または胚幹細胞であり、その中にB L A Aをコードする配列が導入されている。次いで、このような宿主細胞を用いて、外来B L A A配列がそれらのゲノム中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B L A A配列が改変された相対的組換え動物を作成し得る。このような動物は、B L A Aの機能および/または活性を研究するため、ならびにB L A A活性のモデ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。本明細書で用いる用語「トランスジェニック動物」は、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラットまたはマウスのようなげっ歯類であり、ここでは、動物の1つ以上の細胞が移入遺伝子を含む。トランスジェニック動物のその他の例は、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などを含む。移入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生し、しかも成熟動物のゲノム中に残り、それによってこの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中でコードされた遺伝子産物の発現を指向する細胞のゲノム中に組み込まれる外来DNAである。本明細書で用いる用語「相対的組換え動物」は、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り、ここでは、内因性B L A A遺伝子が、内因性遺伝子と、動物の細胞（例えば、動物の発生前の動物の胎児細胞）中に導入された外来DNA分子との間の相対的組換えにより改変されている。

#### 【0121】

本発明のトランスジェニック動物は、BLAAをコードする核酸を、受精卵母細胞の雄前核中に、例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって導入すること、およびこの卵母細胞を偽妊娠雌養動物中で発達させることによって作成され得る。配列番号1、3、5、7、9、または11のヒトBLAA cDNA配列は、非ヒト動物のゲノム中に移入遺伝子として導入され得る。あるいは、マウスBLAA遺伝子のようなヒトBLAA遺伝子の非ヒト相同体が、ヒトBLAA cDNA(上記にさらに記載される)へのハイブリダイゼーションを基に単離され、そして移入遺伝子として用いられ得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた、移入遺伝子中に含まれ得、移入遺伝子の発現の効率を増大し得る。組織特異的調節配列(単数または複数)が、BLAA移入遺伝子に作動可能に連結され、特定細胞にBLAAポリペプチドの発現をさせる。胚操作およびマイクロインジェクションによるトランスジェニック動物(特にモウスのような動物)を生成するための方法は、当該分野では従来法となり、そして、例えば、米国特許第4,736,866号;同4,870,009号;および第4,873,191号;ならびにHogan 1986、MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.に記載されている。類似の方法が、その他のトランスジェニック動物の生成のために用いられる。トランスジェニック初代動物は、この動物の組織または細胞中の、そのゲノムにおけるBLAA移入遺伝子の存在、および/またはBLAA mRNAの発現を基に識別されえる。次いで、トランスジェニック初代動物を用いて、この移入遺伝子を保持するさらなる動物を育種し得る。さらに、BLAAをコードする移入遺伝子を保持するトランスジェニック動物を、その他の移入遺伝子を保持するトランスジェニック動物と交配し得る。

#### 【0122】

相同的組換え動物を作成するために、少なくともBLAA遺伝子の一部分を含むベクターが調製される。このBLAA遺伝子の一部には、欠失、付加または置換が導入され、それによって、BLAA遺伝子を改変、例えば、機能的に破壊する。このBLAA遺伝子は、ヒト遺伝子(例えば、配列番号1、3、5、7、9

、または11)であり得るが、より好ましくはヒトBLAA遺伝子の非ヒト相同体である。例えば、配列番号1、3、5、7、9、または11のヒトBLAA遺伝子のマウス相同体を用いて、マウスゲノム中の内因性BLAA遺伝子を改変するために適切な相同的組換えベクターを構築し得る。1つの実施形態で、ベクターは、相同的組換えに際し、内因性BLAA遺伝子が機能的に破壊されるように設計される(すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない;「ノックアウト」ベクターとも呼ばれる)。

#### 【0123】

あるいは、ベクターは、相同的組換えに際し、内因性BLAA遺伝子が変異するかまたはそうでなければ改変されるが、なお機能的タンパク質をコードするように設計され得る(例えば、上流調節領域が改変され、それによって内因性BLAAポリペプチドの発現を改変し得る)。相同的組換えベクターにおいて、BLAA遺伝子の改変された部分は、BLAA遺伝子のさらなる核酸がその5'および3'末端に隣接し、胚幹細胞中で、ベクターにより保持される外来BLAA遺伝子と内因性BLAA遺伝子との間で相同的組換えを可能にする。このさらなる隣接BLAA核酸は、内因性遺伝子との成功する相同的組換えに十分な長さである。代表的には、数キロベースの隣接DNA(5'および3'末端の両方)がベクター中に含まれる。相同的組換えベクターの記述については、例えば、Thomasら(1987)Cell 51:503を参照のこと。ベクターは、胚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り)、そして導入されたBLAA遺伝子が内因性BLAA遺伝子と相同的に組換わった細胞が選択される(例えば、Liら(1992)Cell 69:915を参照のこと)。

#### 【0124】

次いで、選択された細胞を、動物(例えば、マウス)の未分化胚芽細胞中に注入し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、キメラ胚を適切な偽妊娠雌養動物中に移植し得、そして胚を発芽させる。それらの発芽細胞中に相同的

に組換えたDNAを保持する子孫を用いて、動物のすべての細胞が移入遺伝子の生殖系列により相同的に組み替えたDNAを含む動物を繁殖し得る。相同的組換えベクターおよび相同的組換え動物を構築するための方法は、Bradley (1991) *Curr Opin Biotechnol* 2:823-829; PCT国際公開番号: WO90/11354; WO91/01140; WO92/0968; およびWO93/04169に記載されている。

#### 【0125】

別の実施形態では、移入遺伝子の調節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生成され得る。このような系の1つの例は、細菌ファージ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記述については、Laksora (1992) *PNAS* 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)。cre/loxPリコンビナーゼ系を用いて移入遺伝子の発現を調節する場合、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移入遺伝子を含む動物が必要である。このような動物は、「二重」トランスジェニック動物の構築、例えば、一方が選択されたタンパク質をコードする移入遺伝子を含み、そして他方がリコンビナーゼをコードする移入遺伝子を含む2つのトランスジェニック動物を交配することにより提供され得る。

#### 【0126】

本明細書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に記載の方法に従って生成され得る。簡単に述べれば、トランスジェニック動物から細胞、例えば体細胞が単離され、そして成長周期を出て、G<sub>0</sub>相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により、この静止細胞が単離される種と同じ種の動物から除核され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、それが、桑実胚または胚芽細胞に発生するように培養され、次いで偽妊娠雌養動物に移される。この雌の養動物に担われた子孫は、細胞

、例えば、体細胞が単離された動物のクローンである。

【0127】

(薬学的組成物)

本発明のBLAA核酸分子、BLAAポリペプチド、および抗BLAA抗体(本明細書では「活性化合物」ともいう)、およびその誘導體、フラグメント、アナログ、相同体は、治療に適切な薬学的組成物中に取り込まれ得る。代表的には、このような組成物は、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む。本明細書で用いる「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与に適合する、任意およびすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌薬剤、等張剤および吸収遅延剤などを包含することを意図する。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であるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されており、これは、本明細書に参考として援用される。このようなキャリアまたは希釈剤の好適な例は、制限されないで、水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンを包含する。リポソームおよび動物油(fixed oil)のような非水性ビヒクルもまた用いられ得る。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。活性化合物と適合しない任意の従来媒体または薬剤の範囲を除いて、組成物におけるそれらの使用が意図される。補助的な活性化合物もまたこの組成物中に取り込まれ得る。

【0128】

本発明の薬学的組成物は、その投与の意図された経路と適合するように処方される。投与の経路の例は、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口(例えば、吸入)、経皮(局所)、経粘膜、および直腸投与を包含する。非経口、経皮、または皮下適用のための溶液または懸濁液は以下の成分を含み得る：注射液のような滅菌希釈剤、生理食塩水、動物油、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その他の合成溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗細菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤；アセテート、シトレ

ートまたはホスフェートのような緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような浸透圧調節のための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基で調節され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックから作られる、アンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量バイアルに収容され得る。

#### 【0129】

注射可能な使用に適切な薬学的組成物は、滅菌注射用溶液または分散液の即席調製物のための滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散物、および滅菌粉末を含む。静脈内投与には、適切なキャリアは、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（登録商標）（BASF、Parsippany, NJ.）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を含む。すべての場合において、組成物は殺菌されなければならない、そして容易に注射できる程度の流体であるべきである。それは、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない、そして細菌および真菌のような微生物の汚染作用に対して保存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。適正な流動性が、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散物の場合には必要な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗細菌および抗真菌薬剤により達成され得、これには、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、チメロザールなどが含まれる。多くの場合、組成物中に、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコール、塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましい。注射組成物の延長された吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延する薬物を含めることによりもたらされ得る。

#### 【0130】

滅菌注射溶液は、適切な溶媒中に、必要な量の活性化化合物（例えば、BLAAポリペプチドまたは抗BLAA抗体）を、必要に応じて上記に列挙した成分またはその組合せとともに取り込むこと、次いで滅菌濾過することによって調製され

得る。一般に、分散物は、基礎分散媒体および上記に列挙された成分のうち必要なその他の成分を含む滅菌ビヒクル中に取り込むことにより調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の方法は、活性成分プラス先に滅菌濾過されたその溶液からの任意の所望の成分の粉末を生じる真空感想および凍結乾燥である。

#### 【0131】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用キャリアを包含する。それらは、ゼラチンカプセル中に封入され得るか、または錠剤に圧縮され得る。経口治療投与の目的には、活性化合物を賦形剤とともに取り込み得、そして錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で用いられる得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュとしての使用のために、流体キャリアを用いて調製され得、ここで、この流体キャリア中の化合物は、経口的に適用され、そして音をたてて動き、そして喀痰されるかまたは飲み込まれる。薬学的に適合する結合剤、および/またはアジュバント材料が組成物の一部分として含まれ得る。錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは、以下の成分または類似の性質の化合物をいずれかを含み得る：微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチンのようなバインダー；スターチまたはラクトースのような賦形剤、アルギン酸、Primogel、またはコーンスターチのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはSterotesのような潤滑剤；コロイド二酸化珪素のような滑剤；スクロースまたはサッカリンのような甘味料；またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香料のような香料。

#### 【0132】

吸入による投与には、化合物は、例えば、二酸化炭素、またはネブライザーのようなガスである適切な推進剤を含む、加圧コンテナまたはディスペンサからのエアロゾルスプレーの形態で送達され得る。

#### 【0133】

全身投与はまた、経粘膜または経皮手段によってであり得る。経粘膜または経皮投与には、浸透されるバリアに適切な浸透剤が処方物中に用いられる。このような浸透剤は、一般に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与に

は、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、鼻スプレーまたは坐薬の使用により達成され得る。経皮投与には、活性化合物は、当該分野で一般に知られるように、軟膏 ( o i n t m e n t )、軟膏 ( s a l v e s )、ゲル、またはクリームに処方され得る。

#### 【0134】

化合物はまた、(例えば、ココアバターおよびその他のグリセリドのような従来の坐薬とともに)坐薬また直腸送達のための滞留浣腸剤の形態で調製され得る。

#### 【0135】

1つの実施形態では、活性成分は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御された放出処方物のように、身体からの急速な放出に対して化合物を保護するキャリアとともに調製される。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性の生体適合性ポリマーが用いられ得る。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。このような材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から入手可能である。リポソーム懸濁液(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染細胞に標的化されたりポソームを含む)もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして用いられ得る。これらは、例えば、米国特許第4、522、811号に記載のように、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

#### 【0136】

投与の場合および投与量の均一性のために、用量単位形態で経口または非経口組成物を処方することが特に有利である。本明細書で用いる用量単位形態は、処置される被験体に対する単位の用量として適した物理的に別の単位をいい；各々の単位は、必要なキャリアとともに所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。本発明の用量単位形態の仕様は、活性化合物の特有の性質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このような化合物を調合する当該技術分野に固有の制限によって指令され、そしてそれらに直接依存する。

## 【0137】

本発明の核酸分子はベクター中に挿入され、そして遺伝子治療ベクターとして用いられ得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注入、局所投与（米国特許第5,328,470号）により、または定位（stereotactic）注入（例えば、Chenら（1994）PNAS 91:3054~3057を参照のこと）により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、受容可能希釈剤中の遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子治療ベクターが包埋される緩慢放出マトリックスを包含し得る。あるいは、例えば、レトロウイルスベクターのように、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に生成され得る場合には、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。

## 【0138】

薬学的組成物は、投与の指示書とともに、容器、パック、またはディスペンサー中に含まれ得る。

## 【0139】

（発明の使用および方法）

免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーは、多くの機能を調整する多機能の分泌タンパク質および膜結合タンパク質を含む。先行技術で知られるB7分子は、細胞表面上に位置する（Selvakumarら、1992、Immunogenetics 36:175~181およびLinsleyら、1994、Protein Sc. 3:1341~1343を参照のこと）。先行技術で公知のプログラム（例えば、PSORT）を用いる配列分析研究は、本発明のポリペプチドが、小胞体の膜に局在化する可能性が最も高いことを示す。本明細書で記載される核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、および抗体は、以下の方法の1つ以上において用いられ得る：（a）スクリーニングアッセイ；（b）検出アッセイ（例えば、染色体マッピング、組織型決定、法医学生物学）；（c）予測医学（例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、モニタリング臨床試験、および薬物ゲノミクス）；および（d）処置の方法（例えば、治療および予防）。本明細書で記載のように、1つの実施形態では、本発明のBLAAポリペプチドは

、活性化Tリンパ球に結合する能力を有し、そしてTリンパ球細胞増殖および活性化のための調節シグナルを提供する。BLAAポリペプチドは、他の細胞タンパク質と相互作用し、そしてそれ故、免疫応答に関連するタンパク質活性を調整するために用いられ得る。このような調整は、細胞増殖の調節、細胞分化の調節、および/または細胞生存の調節に対する影響を有し得る。

#### 【0140】

さらに以下に記載されるように、本発明の単離された核酸分子を用いて、BLAAポリペプチドを発現し（例えば、遺伝子治療適用において宿主細胞中の組換え発現ベクターにより）、BLAA mRNA（例えば、生物学的試料中）またはBLAA遺伝子中の遺伝子損傷を検出し、BLAA活性を調整し得る。さらに、BLAAポリペプチドを用いて、BLAA活性または発現を調整する薬物または化合物をスクリーニングし、およびBLAAポリペプチドの不十分または過剰産生、またはBLAA野生型ポリペプチドと比較して減少または異常活性を有するBLAAポリペプチド形態の産生により特徴付けられる障害を処置し得る（例えば、感染性疾患、癌、自己免疫疾患、および移植にともなう合併症）。さらに、本発明の抗BLAA抗体を用いて、BLAAポリペプチドを検出および単離し、そしてBLAA活性を調整し得る。

#### 【0141】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤、および本明細書に記載のような処置のためのそれらの使用に関する。

#### 【0142】

（スクリーニングアッセイ）

本発明は、モジュレーター、すなわち、BLAAポリペプチドに結合するか、または例えばBLAA発現またはBLAA活性に対して刺激もしくは阻害効果を有する、候補もしくは試験化合物もしくは薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、小分子またはその他の薬物）を同定するための方法を提供する（本明細書では「スクリーニングアッセイ」ともいう）。

#### 【0143】

1つの実施形態で、本発明は、BLAAタンパク質もしくはポリペプチドもし

くはその生物学的に活性な一部分に結合かまたはそれらを調整する候補もしく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、当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを用いて得られ得、これには；生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；脱旋回を必要と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用いる合成ライブラリー法が含まれる。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られるが、その他の4つのアプローチは、ペプチド、化合物の非ペプチドオリゴマーまたは小分子ライブラリーに適用可能である(Lam(1997) Anticancer Drug Des 12:145)。

【0144】

分子ライブラリーの合成方法の例は、当該分野に見出され得る。例えば、De Witt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；Carrellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2061；およびGallopら(1994) J Med Chem 37:1233。

【0145】

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)、孢子(Ladner 米国特許'429)、プラスミド(Cullら(1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865~1869)またはファージ上(ScottおよびSmith(

1990) Science 249:386~390; Devlin (1990) Science 249:404~406; Cwirła (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87:6378~6382; Felici (1991) J Mol Biol 222:301~310; Ladner (上記) に提示され得る。

#### 【0146】

1つの実施形態で、アッセイは細胞を基礎にしたアッセイであり、そこでは、細胞表面上で、BLAAポリペプチド、または生物学的に活性なその部分の形態を発現する細胞が、試験化合物と接触し、そして試験化合物のBLAAタンパク質に結合する能力が決定される。細胞は、例えば、哺乳動物起源であるか、または酵母細胞であり得る。試験化合物のBLAAポリペプチドに結合する能力を決定することは、例えば、試験化合物をラジオアイソトープまたは酵素標識と、試験化合物のBLAAポリペプチドまたは生物学的に活性なその部分への結合が、複合体中の標識された化合物を検出することにより決定され得るように結合することによって達成され得る。例えば、試験化合物は、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、または $^3\text{H}$ で、直接的または間接的に標識され得、そしてラジオアイソトープが、放射線放出の直接計測によるかシンチレーション計測により検出される。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標識され得、この酵素標識は、適切な基質の産物への変換の測定により検出される。1つの実施形態では、このアッセイは、BLAAポリペプチドの膜結合形態、または生物学的に活性なその部分を細胞表面上で発現する細胞を、BLAAを結合し、アッセイ混合物を形成する既知化合物と接触する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触する工程、および試験化合物がBLAAポリペプチドと相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がBLAAポリペプチドと相互作用する能力を決定する工程が、既知化合物と比較したとき、この試験化合物のBLAAまたは生物学的に活性なその部分に優先的に結合する能力を決定することを包含する。

#### 【0147】

別の実施形態では、アッセイは、細胞を基礎にしたアッセイであり、これは、

B L A A ポリペプチドの膜結合形態、または生物学的に活性なその部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、およびこの B L A A ポリペプチドの膜結合形態、または生物学的に活性なその部分の活性を調整（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。B L A A、または生物学的に活性なその部分の活性を調整する試験化合物の能力を決定する工程は、例えば、B L A A ポリペプチドの B L A A 標的分子に結合またはそれと相互作用する能力を決定することにより達成され得る。本明細書で用いる用語「標的分子」は、それと B L A A ポリペプチドが本来結合または相互作用する分子、例えば、B L A A と相互作用する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、細胞外環境中の分子、細胞膜の内表面に結合する分子または細胞質分子である。B L A A 標的分子は、本発明の非 B L A A 分子または B L A A タンパク質もしくはポリペプチドであり得る。1 つの実施形態で、B L A A 標的分子は、細胞膜を通過して細胞中に細胞外シグナル（例えば、膜結合 B L A A 分子への化合物の結合により生成されるシグナル）の伝達を容易にするシグナル伝達経路の成分である。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であるか、または下流シグナル伝達分子の B L A A との結合を容易にするタンパク質であり得る。

#### 【0148】

B L A A ポリペプチドの B L A A 標的分子と結合または相互作用する能力を決定することは、直接結合を決定するための上記の方法の 1 つにより達成され得る。1 つの実施形態で、B L A A ポリペプチドの B L A A 標的分子と結合または相互作用する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り達成され得る。例えば、標的分子の活性は、標的の細胞内第 2 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）の誘導を検出すること、適切な基質に対する標的の触媒 / 酵素活性を検出すること、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連結された B L A A 応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出すること、または細胞応答、例えば、細胞生存、細胞分化、または細胞増殖を検出することにより決定され得る。

## 【0149】

なお別の実施形態では、本発明のアッセイは、細胞フリーアッセイであり、これは、B L A Aポリペプチドまたは生物学的に活性なその部分を試験化合物と接触させる工程、および試験化合物のB L A Aポリペプチドまたは生物学的に活性なその部分に結合する能力を決定する工程を包含する。試験化合物のB L A Aポリペプチドへの結合は、上記のように、直接的または間接的いずれかで決定され得る。1つの実施形態で、このアッセイは、B L A Aポリペプチドまたは生物学的に活性なその部分を、B L A Aを結合し、アッセイ混合物を形成する既知化合物と接触する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触する工程、および試験化合物がB L A Aポリペプチドと相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がB L A Aポリペプチドと相互作用する能力を決定する工程が、既知化合物と比較したとき、この試験化合物のB L A Aまたは生物学的に活性なその部分に優先的に結合する能力を決定することを包含する。

## 【0150】

別の実施形態では、アッセイは、細胞フリーアッセイであり、これは、B L A Aポリペプチドまたは生物学的に活性なその部分を試験化合物と接触させる工程、およびB L A Aポリペプチドまたは生物学的に活性なその部分の活性を調整（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。B L A Aの活性を調整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つによる、B L A AポリペプチドのB L A A標的分子に結合する能力を決定することに達成され得る。代替の実施形態では、B L A Aの活性を調整する試験化合物の能力を決定する工程は、B L A AポリペプチドのB L A A標的分子をさらに調整する能力を決定することにより達成され得る。例えば、適切な基質に対する標的分子の触媒/酵素活性が先に記載のように決定され得る。

## 【0151】

なお別の実施形態では、この細胞フリーアッセイは、B L A Aポリペプチドまたは生物学的に活性なその部分を、B L A Aを結合し、アッセイ混合物を形成する既知化合物と接触する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触する工程

、および試験化合物がBLAAポリペプチドと相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がBLAAポリペプチドと相互作用する能力を決定する工程が、BLAAポリペプチドの、BLAA標的分子に優先的に結合またはこれを調整する能力を決定することを包含する。

#### 【0152】

本発明の細胞フリーアッセイは、BLAAの可溶性形態または膜結合形態の両方の使用に適用可能である。膜結合形態のBLAAを包含する細胞フリーアッセイの場合、可溶化剤を、この膜結合形態のBLAAが溶液中に維持されるように利用することが所望され得る。このような可溶化剤の例は、*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）<sub>n</sub>、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンミニオール-1-プロパンスルホネート（CHAPS）、または3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンミニオール-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート（CHAPSO）のような非イオン性界面活性剤を含む。

#### 【0153】

本発明の上記のアッセイ方法の1つ以上の実施形態で、BLAAまたはその標的分子のいずれかを、タンパク質の1つまたは両方の非複合体化形態からの複合体化形態の分離を容易にするため、およびアッセイの自動化に適応するために固定化することが所望され得る。試験化合物のBLAAへの結合、または候補化合物の存在下または不在下の標的分子とのBLAAの相互作用は、反応体を含むために適切な任意のベッセル中で達成され得る。このようなベッセルの例は、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管を含む。1つの実施形態では、1つまたは両方のタンパク質がマトリッ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-BLAA融合タンパク質またはGST-標的融合タンパク質が、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、次いでそれは、試験化合物と、または試験化合物と非吸着標的タンパク質もしくはBLAAポリペプチドのいずれかと組み合わせられ、そしてこの混合物は、複合体形成を行う条件下 (例えば、塩およびpHについて生理学的条件) でインキュベートされる。インキュベーションの後、この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、任意の非結合成分を除去し、ビーズの場合固定化されたマトリックス、複合体が、例えば、上記のように直接的または間接的いずれかで測定される。あるいは、これら複合体は、マトリックスから解離され得、そしてBLAA結合または活性のレベル標準的な技法を用いて決定される。

#### 【0154】

マトリックス上にタンパク質を固定化するその他の技法もまた、本発明のスクリーニングアッセイで用いられ得る。例えば、BLAAまたはその標的分子のいずれかをビオチンおよびストレプトアビジンの結合を利用して固定化し得る。ビオチン化BLAAまたは標的分子は、当該分野で周知の技法 (例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, III) を用いてビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシンイミド) から調製され、そしてストレプトアビジンでコートされた96ウェルプレート (Pierce Chemical) のウェルに固定化され得る。あるいは、BLAAまたは標的分子と反応性であるが、BLAAタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体をプレートのウェルに誘導体化し得、そして非結合標的またはBLAAを抗体結合によりウェル中に捕捉する。GST固定化複合体に対する上記の方法に加え、このような複合体を検出する方法は、BLAAまたは標的分子と反応性の抗体を用いる複合体の免疫検出、およびこのBLAAまたは標的分子にともなう酵素活性を検出することによる酵素結合アッセイを含む。

#### 【0155】

別の実施形態では、BLAA発現のモジュレーターが、細胞を候補化合物と接触させ、そしてこの細胞中のBLAA mRNAまたはポリペプチドの発現が決定される方法で同定される。候補化合物の存在下で、BLAA mRNAまたは

ポリペプチドの発現のレベルが、候補化合物の不在下のBLAA mRNAまたはポリペプチドの発現のレベルと比較される。次いで、この候補化合物が、この比較に基づいてBLAA発現のモジュレーターであると同定され得る。例えば、候補化合物の存在下のBLAA mRNAまたはポリペプチドの発現のレベルが、その不在下より大きいとき（統計的に有意により大きい）、この候補化合物は、BLAA mRNAまたはポリペプチド発現の刺激剤であると同定される。あるいは、候補化合物の存在下のBLAA mRNAまたはポリペプチドの発現のレベルが、その不在下より少ないとき（統計的に有意により少ない）、この候補化合物は、BLAA mRNAまたはポリペプチド発現の阻害剤であると同定される。細胞中のBLAA mRNAまたはポリペプチド発現のレベルは、BLAA mRNAまたはタンパク質を検出するための本明細書に記載の方法により決定され得る。

#### 【0156】

なお別の実施形態では、BLAAポリペプチドを、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）における「餌タンパク質」として用い、BLAAと結合または相互作用し、そしてBLAA活性を調整するその他のタンパク質を同定し得る（「BLAA結合性タンパク質」または「BLAA-bp」）。このようなBLAA結合性タンパク質はまた、例えば、BLAA経路の上流または下流エレメントとして、BLAAポリペプチドによるシグナルの伝播に関与しているようである。

#### 【0157】

ツーハイブリッド系は、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大部分の転写因子のモジュレーター性質を基礎にする。簡単に述べれば、このアッセイは、2つの異なる構築物を利用する。1つの構築物では、BLAA

Aをコードする遺伝子が、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に融合される。他方の構築物では、未同定タンパク質（「餌食」または「試料」）をコードする、DNA配列のライブラリーからのDNA配列が、既知転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「餌」および「餌食」タンパク質が、インビボでBLAA-依存複合体を形成して相互作用し得るとき、この転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、緊密に接近している。この接近度は、この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ているレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写を可能にする。このレポーター遺伝子の発現が検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーが単離され、BLAAと相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得るために用いられ得る。

#### 【0158】

別の実施形態では、免疫応答性関連疾患の活性もしくは潜在性（すなわち、活性の欠如）またはそれに対する素因のモジュレーターが同定され、そこでは、免疫応答性関連疾患に対するリスクが増加している試験動物に、試験化合物が投与される。この実施形態の試験動物は、BLAAポリペプチドを組換えにより発現する。次いで、このポリペプチドの活性を試験動物中で測定する。次に、このポリペプチドの活性を、このポリペプチドを組換えにより発現するが、免疫応答性関連疾患に対するリスクが増加していないコントロール動物中で測定する。最後に、試験動物中の発現を、コントロール動物中の発現と比較する。コントロール動物に対する試験動物中の差異は、試験化合物が免疫応答性関連疾患の活性もしくは潜在性またはそれに対する素因のモジュレーターであることを示す。例えば、試験動物における発現の増加は、試験化合物が免疫応答性疾患の刺激剤であることを示す。同様に、試験動物における発現の減少は、試験化合物が免疫応答性疾患の阻害剤であることを示す。

#### 【0159】

試験動物は、上記のように、試験タンパク質移入遺伝子を発現するか、または野生型試験動物に比較して増加したレベルでこの移入遺伝子をプロモーターの制御下に発現する、組換え試験動物であり得る。この実施形態では、このプロモ-

ターは、この移入遺伝子のネイティブなプロモーターではない。

【0160】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規薬剤、および本明細書に記載の処置のためのその使用に関する。

【0161】

(検出アッセイ)

本明細書で同定される cDNA 配列の部分またはフラグメント (および対応する完全遺伝子配列) は、ポリヌクレオチド試薬として多くの様式で用いられ得る。例えば、これらの配列は: (i) それらの個々の遺伝子を染色体上にマッピングするため; そしてそれ故、遺伝子疾患に関連する遺伝子領域を位置決めするため; および (ii) 微小生物学的試料から個体を識別するため (組織型決定) に用いられ得る。これらの適用は、以下のサブセクションに記載される。

【0162】

(染色体マッピング)

一旦遺伝子の配列 (またはこの配列の部分) が単離されると、この配列を用いて染色体上のこの遺伝子の位置をマッピングし得る。このプロセスは、染色体マッピングと呼ばれる。従って、本明細書に記載の B L A A 配列の部分またはフラグメントは、染色体上の複数の B L A A 遺伝子の位置を個々にマッピングするために用いられ得る。この B L A A 配列の染色体へのマッピングは、これらの配列を疾患に関連する遺伝子と関連させることで重要な最初のステップである。

【0163】

簡単に述べると、B L A A 遺伝子は、この B L A A 配列から P C R プライマー (好ましくは長さが 15 ~ 25 b p) を調製することにより染色体にマッピングされ得る。B L A A 配列のコンピューター分析を用いて、ゲノム DNA 中の 1 つ以上のエクソンにまたがり、それ故、増幅プロセスを複雑にするプライマーでないプライマーを迅速に選択し得る。次いで、これらのプライマーを、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドの P C R スクリーニングのために用い得る。この B L A A 配列に対応するヒト遺伝子を含むようなハイブリッドのみが増幅されたフラグメントを生じる。

## 【0164】

体細胞ハイブリッドは、異なる哺乳動物（例えば、ヒトおよびマウス細胞）からの体細胞を融合することにより調製される。ヒトとマウス細胞のハイブリッドが成長および分裂するにつれ、それらはランダムな順序でヒト染色体を徐々に失うが、マウス染色体は維持する。マウス細胞が特定の酵素を欠くため、それらが増殖できない培地（しかしヒト細胞は増殖し得る）を用いることにより、必要な酵素をコードする遺伝子を含む1つのヒト染色体が維持される。種々の培地を用いることにより、ハイブリッド細胞株のパネルが確立され得る。パネル中の各細胞株は、1つのヒト染色体または小数のヒト染色体のいずれか、および完全なセットのマウス染色体を含み、個々の遺伝子を特定のヒト染色体に容易にマッピングすることを可能にする（D' E u s t a c h i o ら（1983）*S c i e n c e* 220:919-924）。ヒト染色体のフラグメントのみを含む体細胞ハイブリッドもまた、転座および欠失をもつヒト染色体を用いることにより生成され得る。

## 【0165】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の配列を特定の染色体に割り当てる迅速な手法である。1つのサーマルサイクラーを用いて1日あたり3つ以上の配列が割り当てられ得る。オリゴヌクレオチドプライマーを設計するためにBLAA配列を用い、特定染色体からのフラグメントのパネルとともにサブ局在化が達成され得る。

## 【0166】

中期染色体展着へのDNA配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）をさらに用い、1ステップで正確な染色体位置を提供し得る。染色体展着は、有糸分裂紡錘体を破壊するコルセミドのような化学薬品によりその分裂が中期でブロックされる細胞を用いることにより作成され得る。染色体はトリプシンで簡単に処理され、次いでGiemsaで染色され得る。明暗バンドのパターンが各染色体上で現われ、その結果染色体が個々に識別され得る。このFISH技法は、500または600塩基ほどの長さのDNA配列とともに用いられ得る。しかし、1,000塩基より大きいクローンは、単一検出のために十分なシ

グナル強度で特有の染色体位置に結合するより高い可能性を有する。好ましくは、1,000塩基、そしてより好ましくは、2,000塩基が、合理的な長さの時間で良好な結果を得るに十分である。この技法の総説には、Vermaら、HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES (Pergamon Press New York 1988)を参照のこと。

【0167】

染色体マッピングのための試薬を用い、単一染色体、またはその染色体上の単一部位を個々に特徴付け得るか、または試薬のパネルを用いて、複数部位および/または複数染色体を特徴付け得る。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は、実際にマッピング目的に好適である。コード領域は、遺伝子ファミリー内で保存される傾向がより高く、染色体マッピングの間に交差ハイブリダイゼーションの機会を増加する。

【0168】

一旦、配列が正確な染色体位置にマップされると、この染色体上の配列の物理的位置が、遺伝子マップデータと関連付けられ得る。このようなデータは、例えば、Johns Hopkins University Welch Medical Libraryによりオンラインで利用可能な、McKusick、MENDELIAN INHERITANCE IN MANに見出される。次いで、同じ染色体領域にマップされた遺伝子と疾患との間の関係は、例えば、Egelandら(1987) Nature 325:783~787に記載の連鎖分析(物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝)により同定され得る。

【0169】

さらに、このBLAA遺伝子に関連する疾患に影響され、および影響されない個体間のDNA配列における差異が決定され得る。変異が、任意の影響されない個体では観察されず、影響された個体のいくつかまたはすべてで観察される場合、この変異は、特定の疾患の原因因子である可能性が高い。影響され個体および影響されない個体の比較は、一般に、染色体展着から見えるか、またはそのDNA配列に基づくPCRを用いて検出可能である欠失または転座のような、染色体

における構造的改変を捜すことを最初に含む。最終的には、いくつかの個体からの遺伝子の完全配列決定が、変異の存在を確認するため、および多形から変異を区別するために実施され得る。

#### 【0170】

##### (組織型決定)

本発明のBLAA配列はまた、微小な生物学的試料から個体を同定するために用いられ得る。この技法では、個体のゲノムDNAを1つ以上の制限酵素で消化し、そしてサザンブロット上でプローブして同定のための特有のバンドを生じる。本発明の配列は、RFLP(米国特許第5,272,057号に記載の「制限フラグメント長多形」)のためのさらなるDNAマーカーとして有用である。

#### 【0171】

さらに、本発明の配列を用い、個体のゲノムの選択された部分の実際の塩基毎のDNA配列を決定する代替の技法を提供し得る。従って、本明細書に記載のBLAA配列は、これら配列の5'配列および3'配列末端から2つのPCRプライマーを調製するために用いられ得る。次いで、これらのプライマーを用いて個々のDNAを増幅し、そして次いでそれを配列決定する。

#### 【0172】

このように調製された個体からの対応するDNA配列のパネルは、特有の個体の識別を提供し得る。なぜなら、各個体は、対立遺伝子の差異に起因してこのようなDNA配列の特有のセットを有するからである。本発明の配列は、個体および組織からこのような識別配列を得るために用いられ得る。本発明のBLAA配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。これら配列のコード領域では、ある程度の対立遺伝子の変動があり、そして非コード領域ではより大きな程度の変動がある。個々のヒト間の対立遺伝子の変動は、各500塩基あたり約1つの頻度で生じると推定される。対立遺伝子の変動の多くは、単一ヌクレオチド多形(SNP)に起因し、これは、制限フラグメント長多形(RFLP)を含む。

#### 【0173】

本明細書に記載の配列の各々は、ある程度まで、これに対して個体からのDNAが識別目的のために比較され得る標準として用いられ得る。非コード領域では

より多くの数の多形が生じるので、個体を鑑別するためにより少ない配列が必要である。配列番号1、配列番号3、および配列番号5（それぞれ、配列番号8、10、および12）の非コード配列は、各々が100塩基の非コード増幅配列を生じるおそらく10~1,000プライマーのパネルでポジティブな個体識別を安楽に提供し得る。配列番号1、3、5、7、9、および11におけるような、予測されるコード配列が用いられるとき、個体のポジティブな識別のためのプライマーのより適切な数は、500~2000であり得る。

#### 【0174】

（予測医学）

本発明はまた予測医学の分野に関し、ここでは、診断アッセイ、予後アッセイ、薬物ゲノミクス、およびモニタリング臨床試験が、予後（予測）目的のために用いられ、それによって個体を予防的に処置する。従って、本発明の1つの局面は、生物学的試料（例えば、血液、血清、細胞組織）に関し、BLAAポリペプチドおよび/または核酸発現ならびにBLAA活性を決定するための診断アッセイに関し、それによって、個体が疾患または障害に罹患しているか、異常BLAA発現または活性に関連する障害を発症するリスクにあるか否かを決定する。本発明はまた、個体がBLAAポリペプチドまたは核酸発現または活性と関連する障害を発症するリスクにあるか否かを決定するための予後（または予測）アッセイを提供する。例えば、BLAA遺伝子中の変異が、生物学的試料中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後または予測目的のために用いられることができ、それによってBLAAポリペプチドまたは核酸発現または活性によって特徴付けられるか、またはそれらにともなう障害の発症前に個体を予防的に処置する。

#### 【0175】

本発明の別の局面は、個体におけるBLAAポリペプチドまたは核酸発現またはBLAA活性を決定するための方法を提供し、それによってその個体のための適切な治療薬剤または予防薬剤を選択する（本明細書では「薬物ゲノミクス（pharmacogenomics）」という）。薬物ゲノミクスは、個体の遺伝子型（例えば、個体の特定の薬剤に応答する能力を決定するために調べられた遺

伝子型)に基づき個体の治療的または予防的処置のための薬剤(例えば薬物)の選択を可能にする。

【0176】

本発明のなお別の局面は、臨床試験において、BLAAの発現または活性に対する薬剤(例えば、薬物、化合物)の影響をモニタリングすることに関する。

【0177】

これらおよびその他の薬剤は、以下のセクションでより詳細に記載される。

【0178】

(診断アッセイ)

生物学的サンプルにおいてBLAAの存在または非存在を検出するための例示的方法は、試験被験体から生物学的サンプルを入手する工程、およびその生物学的サンプルに、BLAAポリペプチドまたはBLAAをコードする核酸(例えば、mRNA、ゲノムDNA)を検出し得る化合物または因子を接触させて、BLAAの存在を生物学的サンプルにおいて検出する工程を包含する。BLAA mRNAまたはゲノムDNAを検出するための因子は、BLAA mRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る標識された核酸プローブである。例えば、その核酸プローブは、全長BLAA核酸(例えば、配列番号1、3、5、7、8、9、10、11、または12の核酸、あるいはその一部)(例えば、少なくとも15、30、50、100、250または500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチド)であり得、そしてBLAA mRNAまたはゲノムDNAに対してストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするに十分である。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは、本明細書において記載されている。

【0179】

BLAAポリペプチドを検出するための因子は、BLAAタンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメント(例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>)が使用され得る。用語「標識された」とは、プローブまたは抗体に関して、

検出可能な物質をそのプローブまたは抗体に結合することによってそのプローブまたは抗体を直接標識する工程（すなわち、物理的結合）、ならびに直接標識されている別の試薬との反応性によりそのプローブまたは抗体の間接的に標識する工程を包含することを意図する。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出、およびDNAプローブが蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにビオチンを用いたDNAプローブの末端標識する工程が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被検体から単離された、組織、細胞および生物学的流体、ならびに被検体に存在する組織、細胞および流体を包含することを意図する。すなわち、本発明の検出方法を用いて、インビトロおよびインビボで生物学的サンプル中のBLAA mRNA、ポリペプチドまたはゲノムDNAを検出し得る。例えば、BLAA mRNAの検出のためのインビトロ技術には、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが含まれる。BLAAポリペプチドの検出のためのインビトロ技術は、酵素結合免疫ソルベントアッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が含まれる。BLAAゲノムDNAの検出のためのインビトロ技術には、サザンハイブリダイゼーションが含まれる。さらに、BLAAタンパク質の検出のためのインビボ技術には、被検体に標識された抗BLAA抗体を導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカーで標識され得、被検体におけるその存在および位置は、標準的な造影技術によって検出され得る。

#### 【0180】

1つの実施形態において、その生物学的サンプルは、試験被検体からのタンパク質分子を含む。あるいは、その生物学的サンプルは、試験被検体からのmRNA分子または試験被検体からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被検体から従来的手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。

#### 【0181】

別の実施形態において、その方法は、コントロール被検体からコントロール生物学的サンプルを入手する工程、そのコントロールサンプルにBLAAポリペプ

チド、mRNAまたはゲノムDNAを検出し得る化合物または因子を接触させて、BLAAポリペプチド、mRNAまたはゲノムDNAの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される工程、およびその試験サンプルにおいてBLAAポリペプチド、mRNAまたはゲノムDNAの存在と、そのコントロールにおけるBLAAポリペプチド、mRNAまたはゲノムDNAの存在とを比較する工程をさらに包含する。

#### 【0182】

本発明はまた、生物学的サンプルにおいてBLAAの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、そのキットは以下を包含し得る：生物学的サンプルにおいてBLAAポリペプチドもしくはmRNAを検出し得る、標識された化合物または因子；そのサンプルにおいてBLAAの量を決定するための手段；および標準とそのサンプルにおけるBLAAの量を比較するための手段。その化合物または因子は、適切な容器中に包装され得る。そのキットは、BLAAポリペプチドまたは核酸を検出するためのキットを用いるための指示書をさらに含み得る。

#### 【0183】

##### ( 予後アッセイ )

本明細書において記載される診断方法は、異常なBLAA発現または活性に関連する疾患または障害を有するかまたはそれを発症する危険がある被検体を同定するためにさらに利用され得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、その前の診断アッセイまたはその後のアッセイ）は、BLAAポリペプチドまたは核酸発現に関連する免疫応答関連障害（例えば、癌、感染疾患、自己免疫障害、および移植に関連する合併症）を有するかまたはそれを発症する危険のある被検体を同定するために利用され得る。あるいは、予後アッセイは、疾患または障害を有するかまたはそれを発症する危険のある被検体を同定するために利用され得る。従って、本発明は、異常なBLAA発現または活性に関連する疾患または障害を同定するための方法を提供する。この方法において、試験サンプルが被検体から入手され、そしてBLAAポリペプチドまたは核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）が検出され、ここで、BLAAポリペプチドまたは核酸の存在は、異常なBLAA発現または活性に関連する疾患または障害を有するかま

たはそれを発症する危険のある被検体についての診断指標である。本明細書において使用されるように「試験サンプル」は、目的の被検体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプルまたは組織であり得る。

#### 【0184】

さらに、本明細書において記載される予後アッセイを用いて、被検体に、因子（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子または他の薬物候補物）を、異常なBLAA発現または活性に関連する疾患または障害を処置するために投与し得るかどうかを判定し得る。例えば、そのような方法を使用して、障害（例えば、癌、感染疾患、自己免疫障害および移植に関連する合併症）についての因子で被検体が有効に処置され得るかどうかを判定し得る。従って、本発明は、異常なBLAA発現または活性に関連する障害について被検体が因子を用いて有効に処置され得るかどうかを決定するための方法を提供する。ここでは、試験サンプルが入手され、そしてBLAAポリペプチドまたは核酸が検出される（例えば、BLAAポリペプチドまたは核酸は、その因子が投与され得る被検体にとって、異常なBLAA発現または活性に関連する障害を処置することについての指標である）。

#### 【0185】

本発明の方法はまた、BLAA遺伝子において遺伝子損傷を検出し、それにより、損傷を受けた遺伝子を有する被検体が、異常細胞増殖および/または分化によって特徴づけられる障害について危険にあるかどうかを判定するために使用され得る。種々の実施形態において、この方法は、その被検体からの細胞のサンプルにおいて、BLAAポリペプチドをコードする遺伝子の統合性に影響を与える変更の少なくとも1つによって、またはそのBLAA遺伝子の誤発現によって特徴づけられる遺伝子損傷の存在または比存在を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝子損傷は、以下のうち少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：（1）BLAA遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；（2）BLAA遺伝子に対して1つ以上のヌクレオチドの付加；（3）BLAA遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換；（4）BLAA遺伝子の染色体再

配置；(5)BLAA遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更；(6)ゲノムDNAのメチル化パターンのような、BLAA遺伝子の異常な改変；(7)BLAA遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライスパターンの存在；(8)BLAAポリペプチドの非野生型レベル；(9)BLAA遺伝子の対立遺伝子の欠失；ならびに(10)BLAAポリペプチドの不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、BLAA遺伝子において損傷を検出するために使用され得る、当該分野において公知の多数のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的サンプルは、被検体から従来的手段によって単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、核を除いた細胞を含む任意の生物学的サンプル(例えば、頬粘膜細胞を含む)が使用され得る。

#### 【0186】

特定の実施形態において、損傷の検出は、以下を包含する：ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)におけるプローブ/プライマーの使用(例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと)(例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR、あるいは連結連鎖反応(LCR)(例えば、Landegran et al.(1988)Science 241:1077-1080;およびNakazawa et al.(1994)PNAS 91:360-364を参照のこと)(このうちの後者は、BLAA遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る(Abravaya et al.(1995)Nucl Acids Res 23:675-682を参照のこと))。この方法は、以下を包含する：患者から細胞のサンプルを収集する工程、そのサンプルのその細胞から核酸(例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方)を単離する工程、その核酸サンプルに、(存在する場合)BLAA遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下でBLAA遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーを接触させる工程、ならびに増幅産物の存在または非存在を検出する工程、または増幅産物のサイズを検出する工程およびコントロールサンプルに対してその長さを比較する工程。PCRおよび/またはLCRが、本明細書において記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかと組み合わせて予備的な増殖工程として使用するこ

とが所望され得ることが予期される。

【0187】

代替的な増幅方法としては以下が挙げられる：自己維持配列複製 (self sustained sequence replication) (Guatelli et al., 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87:1874-1878)、転写増幅系 (Kwoh, et al., 1989, Proc Natl Acad Sci USA 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ (Lizardi et al, 1988, BioTechnology 6:1197)、または他の任意の核酸増幅法、続いて、当業者に周知の技術を用いた増幅産物の検出。これらの検出スキームは、そのような分子が非常に少数で存在する場合、核酸分子の検出について特に有用である。

【0188】

代替の実施形態において、サンプル細胞からBLAA遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変化によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールのDNAが単離され、増幅(必要に応じて)され、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて消化され、そしてフラグメント長サイズがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長サイズにおける相違は、サンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的ナリボザイム(例えば、米国特許第5,493,531号を参照のこと)は、リボザイム切断部位の発生または欠失による特定の変異の存在についてスコア付けするために使用され得る。

【0189】

他の実施形態において、BLAAにおける遺伝子変異は、サンプルおよびコントロールの核酸(例えば、DNAまたはRNA)を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る(Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244-255; Kozal et al. (1996) Nature Medicine 2:753-759)。例えば、BLAAにお

ける遺伝子変異は、Cronin et al. 前出において記載されるような光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、プローブの第一のハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおいて長いストレッチのDNAにわたり走査して、連続して重複するプローブの線形アレイを作製することによって配列の間の塩基変異を同定し得る。この工程に続き、検出された全ての改変体または変異体に対して相補的な、より小さな特異化されたプローブアレイを用いることにより特定の変異の特徴付けを可能にする第二のハイブリダイゼーションアレイを行う。各々の変異アレイは、並行プローブセットから構成され、そのうち一方は野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方は変異体遺伝子に対して相補的である。

#### 【0190】

なお別の実施形態において、当該分野において公知の任意の種々の配列決定反応を使用して、BLAA遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルBLAAの配列と対応する野生型(コントロール)配列とを比較することによって変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、Maxim and Gilbert (1977) PNAS 74:560またはSanger (1977) PNAS 74:5463によって開発された技術に基づくものが挙げられる。種々の自己配列決定手順のいずれかが、診断アッセイを行う際には利用することができることもまた企図される(Naeve et al., (1995) Biotechniques 19:448)(これには、質量分析による配列分析が含まれる(例えば、PCT国際公開番号WO94/16101号; Cohen et al. (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; およびGriffin et al. (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159を参照のこと) )。

#### 【0191】

BLAA遺伝子における変異を検出するための他の方法は、切断因子からの保護がRNA/RNAまたはRNA/DNAの異種二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出するために用いられる方法(Myers et al. (1985) Science 230:1242)を包含する。一般に、当該分野における技術「

「ミスマッチ切断」は、組織サンプルから得られた可能な変異体RNAまたはDNAを有する野生型BLAA配列と(標識された)RNAまたはDNAとをハイブリダイズさせることによって形成される異種二重鎖を提供することによって開始する。二本鎖二重鎖を、コントロール鎖とサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するような二重鎖の一本鎖領域を切断する因子を用いて処理される。例えば、ミスマッチ領域を酵素的に消化することについて、RNA/DNA二重鎖は、RNアーゼで処理され得、そしてDNA/DNAハイブリッドは、S1ヌクレアーゼで処理され得る。他の実施形態において、DNA/DNAまたはRNA/DNAのいずれかのハイブリッドは、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで、およびピペリジンで処理され得る。次いで、ミスマッチ領域の消化後、変性ポリアクリルゲルの上で、得られた物質をサイズにより分離して変異の部位を決定する。例えば以下を参照のこと：Cotton et al (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleeba et al (1992) Methods Enzymol 217:286-295。1つの実施形態において、そのコントロールDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

#### 【0192】

なお別の実施形態において、ミスマッチは、そのミスマッチ切断反応は、細胞のサンプルから入手されたBLAA cDNAにおける点変異を検出およびマッピングするための所定の系において二本鎖DNAにおけるミスマッチの塩基対を認識する1つ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、HeLa細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15:1657-1662)。例示的な実施形態に従って、BLAA配列に基づくプローブ(例えば、野生型BLAA配列)は、試験細胞からのcDNAまたは他のDNAにハイブリダイズする。この二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素で処理され、そして切断産物は、存在する場合、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、以下を参照のこと：米国特許第5,459,039

号。

【0193】

他の実施形態において、電気泳動移動度における変更を使用して、BLAA遺伝子における変異を同定する。例えば、一本鎖コンフォメーション多型(SSCP)を使用して、変異体核酸と野性が高く酸との間の電気泳動移動度における相違を検出し得る(Orita et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA: 86: 2766, see also Cotton (1993) Mutat Res 285: 125-144; Hayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9: 73-79)。サンプルおよびコントロールBLAA核酸の一本鎖DNAフラグメントが変性され、そして再生させられる。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変動し、電気泳動移動度における得られた変更は、一個の塩基変異でさえ検出することを可能にする。このDNAフラグメントは、標識されたプローブを用いて標識および検出され得る。そのアッセイの感度は、RNA(DNAではなく)を用いて増強され得る。ここで、この二次構造は、配列における変化により感受性である。1つの実施形態において、この方法は、電気泳動移動度における変化に基づいて、二本鎖異種二重鎖分子を分離するために異種二重鎖分析を利用する(Keen et al. (1991) Trends Genet 7: 5)。

【0194】

さらに別の実施形態において、変性剤の勾配を含むポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を用いてアッセイされる(Myers et al (1985) Nature 313: 495)。DGGEが分析方法として用いられる場合、DNAは、それが完全に変性しないことを確実にするように改変される(例えば、PCRによって約40bpの高融点GCリッチDNAのGCクランプを付加することによる)。さらなる実施形態において、温度勾配を、変性勾配の代わりに用いて、コントロールDNAおよびサンプルDNAの移動度における相違を同定する(Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys Chem 265: 12753)。

## 【0195】

点変異を検出するための他の技術の例としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅または選択的プライマー伸長法。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーが、調製され得る。ここでは、公知の変異が中心に配置され、次いで、パーフェクトマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的DNAにハイブリダイズされ得る (Saiki et al. (1986) Nature 324:163; Saiki et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:6230)。そのような対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドは、そのオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする膜に付着し、そして標識された標的DNAとハイブリダイズしたときに、PCR増幅された標的DNAまたは多数の異なる変異に対してハイブリダイズする。

## 【0196】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と組み合わせて用いられ得る。特定の増幅のためにプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、その分子の中心に目的の変異を有し得る（その結果、増幅は、示差的ハイブリダイゼーションに依存する）(Gibbs et al. (1989) Nucleic Acids Res 17:2437-2448)か、または一方のプライマーの3'末端（ここでは、適切な条件下で、ミスマッチが妨害され得るかまたはポリメラーゼ伸長が妨害され得る）に目的の変異を有し得る (Prossner (1993) Tibtech 11:238)。さらに、変異の領域において新規制限部位を導入して切断ベース検出を行うことが所望され得る (Gasparini et al (1992) Mol Cell Probes 6:1)。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅のためにTaqリガーゼを用いて実施され得ることが予定される (Barany (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:189)。そのような場合、連結は、パーフェクトマッチが5'配列の3'末端に存在する場合にのみ生じ、これにより、増幅も存在または非存在を検索することにより、特定の部位における公知の変異の存在を検出することが可能になる。

## 【0197】

本明細書において記載される方法は、例えば、本明細書に記載される、少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を備える予備包装された診断キットを利用することによって行われ得る。これは、例えば、BLAA遺伝子を含む疾患または病気の症状または家族歴を示す患者を診断するための臨床状況において簡便に使用され得る。

## 【0198】

さらに、BLAAが発現する任意の細胞型または組織（好ましくは、末梢白血球）が、本明細書において記載される予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、核除去細胞を含む任意の生物学的サンプル（例えば、頬粘膜細胞）が使用され得る。

## 【0199】

## （薬理ゲノム学）

本明細書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ような、BLAA活性（例えば、BLAA遺伝子発現）に対して刺激または阻害の硬化を有する因子またはモジュレーターを個体に投与して、異常BLAA活性に関連する障害（例えば、癌、感染疾患、自己免疫障害および移植に関連する合併症）を（予防的または治療的に）処置し得る。そのような処置に関連し、その個体の薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と、その個体の、外来化合物または薬物に対する応答との間の関連の研究）が考慮され得る。治療剤の代謝における相違によって、用量と薬理的に活性な薬物の血液濃度との間の関係が変化することにより、重症毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学によって、個体の遺伝子型の考慮に基づいて、予防的または治療的な処置について有効な因子（例えば、薬物）を選択することが可能になる。そのような薬理ゲノム学は、適切な投薬量および治療レジメンを決定するためにさらに用いられ得る。従って、それによって、個体におけるBLAAポリペプチドの活性、BLAA核酸の発現、またはBLAA遺伝子の変異含量が決定されて、それによって、その個体の医療または予防の処置のための適切な因子が選択され得る。

## 【0200】

薬理ゲノム学は、罹患した患者における変更した薬物素因および異常作用に起因した薬物に対する応答において臨床的に有意な遺伝的変動を処理する。例えば、以下を参照のこと：Eichelbaum, Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996, 23:983-985およびLinder, Clin Chem, 1997, 43:254-266。一般に、2つの型の薬理ゲノム学の条件が区別され得る：薬物が身体に作用する方法を変更する単一因子として遺伝する遺伝性条件（変化した薬物作用）または身体が薬物に対して作用する方法を変更する単一因子として遺伝する遺伝性条件（変化した薬物代謝）。これらの薬理ゲノム学条件は、希な欠陥としてまたは多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（G6PD）欠損は、酸化剤薬物（抗マラリア薬、スルホンアミド類、鎮痛剤、ニトロフラン類）およびソラマメの消費の後の、主要な臨床合併症が溶血である一般的な遺伝酵素障害である。

#### 【0201】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、Nアセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）およびシトクロムP450酵素CYP2D6およびCYP2C19）の遺伝的多型の発見は、いくつかの患者が薬物の標準かつ安全な用量を摂取した後、期待された薬物効果が得られないか、または異常な薬物応答および重症毒性を示すことの説明となった。これらの多型は、集団において2つの表現型（広汎な代謝個体（EM）および貧弱な代謝個体（PM））で発現される。PMのまっめんは、異なる集団において異なる。例えば、CYP2D6ラコードする遺伝子は、高度の多型性であり、そしていくつかの変異がPMにおいて同定されており、これらは、すべて機能的CYP2D6の非存在を生じる。CYP2D6およびCYP2C19の貧弱な代謝個体は、それらが標準的な用量を受けるとき、異常な薬物応答および副作用を非常に頻繁に経験する。代謝体が活性治療部分である場合、PMは治療応答を示さない。これは、そのCYP2D6形成される代謝モルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されたとおりである。他の異常は、いわゆる超迅速代謝個体であり、これは、標準的な

用量に応答しない。最近になって、超迅速代謝の分子ベースは、CYP2D6遺伝子増幅に起因すると同定された。

#### 【0202】

従って、個体における、BLAAポリペプチドの活性、BLAA核酸の発現またはBLAA遺伝子の変異体の含量を決定して、それによって、その個体の治療または予防的な処置について適切な因子を選択し得る。さらに、薬理遺伝学研究を使用して、個体の薬物応答表現型の正体に対して薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子を遺伝子型決定することに適用し得る。この知見は、用量決定または薬物選択に適用する場合、本明細書において記載される例示的なスクリーニングアッセイの1つによって同定されるモジュレーターのような、BLAAモジュレーターを用いて被検体を処置するときに、有害反応も治療の失敗も防ぎ得、治療または予防の効力を増強し得る。

#### 【0203】

(臨床試験の間の効果のモニタリング)

BLAAの発現または活性(例えば、異常細胞増殖および/または分化を調節する能力)に対する因子(例えば、薬物、化合物)の影響をモニターすることは、基礎的な薬物スクリーニングに適用され得るのみならず、臨床試験にもまた適用され得る。例えば、本明細書において記載されるスクリーニングアッセイによってBLAA遺伝子発現、タンパク質レベルを増強するかまたはBLAA活性を上方制御すると決定された因子の有効性は、BLAA遺伝子発現、タンパク質レベルが減少したかまたは下方制御されたBLAA活性を示す被検体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、スクリーニングアッセイによってBLAA遺伝子発現、タンパク質レベルを減少するかまたはBLAA活性を下方制御すると決定された因子の有効性は、BLAA遺伝子発現、タンパク質レベルが増加したかまたは上方制御されたBLAA活性を示す被検体の臨床試験においてモニターされ得る。そのような臨床試験において、BLAA(そして好ましくは、例えば、免疫応答関連障害において相関づけられた他の遺伝子)の発現または活性は、特定の細胞の免疫応答の「読み出し」またはマーカーとして使用され得る。

#### 【0204】

例えば、しかし限定ではないが、B L A A活性を調節する因子（例えば、化合物、薬物または低分子）（例えば、本明細書において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）で処置される細胞において調節される遺伝子（B L A Aを含む）が同定され得る。従って、例えば、臨床試験において細胞増強障害に対する因子の効果を研究するために、細胞が単離され得、そしてRNAが調整され得、そしてB L A Aおよびその障害に相関づけられた他の遺伝子の発現レベルについて分析され得る。遺伝子発現のレベル（すなわち、遺伝子発現パターン）は、本明細書に記載されるように、ノーザンブロット分析またはRT-PCRによって定量され得るか、あるいは、本明細書において記載されるような方法の1つによって生成したタンパク質の量を測定することによって定量され得るか、またはB L A Aまたは他の遺伝子の活性レベルを測定することによって定量され得る。このようにして、遺伝子発現パターンは、その因子のその細胞の生理学的応答の指標となるマーカーとして働き得る。従って、この応答状態は、その因子での個体の処置の前、およびその間の種々の点で決定され得る。

#### 【0205】

1つの実施形態において、本発明は、因子（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド模倣体、核酸、低分子または本明細書において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他の薬物候補）での被検体の処置の有効性をモニターするための方法を提供する。この方法は以下の工程を包含する：（i）その因子の投与の前に被検体から投与前サンプルを入手する工程；（ii）予備投与サンプルにおいてB L A Aポリペプチド、mRNAまたはゲノムDNAの発現レベルを検出する工程；（iii）その被検体から1つ以上の投与誤算プルを入手する工程；（iv）B L A Aポリペプチドの発現または活性のレベルを検出する工程；（v）投与後サンプル（単数または複数）におけるB L A Aポリペプチド、mRNAまたはゲノムDNAと、投与前サンプルにおけるB L A Aポリペプチド、mRNAまたはゲノムDNAの発現または活性のレベルを比較する工程；ならびに（vi）それに従ってその被検体に対してその因子の投与を変更する工程。例えば、その因子の投与の増加は、検出されたよりも高いレベルへとB L A Aの発現または活性を増加させること、すなわ

ち、その因子の有効性を増加させるために所望され得る。あるいは、その因子の投与の減少は、検出されるよりも低いレベルにB L A Aの発現または活性を減少させる、すなわち、その因子の有効性を減少させるために所望され得る。

#### 【0206】

(処置の方法)

本発明は、異常なB L A A発現または活性に関連する障害の危険にある(または感受性である)あるいは障害を有する被検体を処置するための予防的方法および治療的方法の両方を提供する。

#### 【0207】

(障害)

増加した(その疾患または障害を罹患していない被検体に対して)レベルまたは生物学的活性によって特徴づけられる疾患および障害が、活性と拮抗(すなわち、減少または阻害)する治療剤で処置され得る。活性と拮抗する治療剤は、治療または予防の様式で投与され得る。利用され得る治療剤としては以下が挙げられるがそれらに限定されない:(i)上記のポリペプチド、そのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ;(ii)上記のポリペプチドに対する抗体;(iii)上記のポリペプチドをコードする核酸;(iv)相同組換えによって上記ペプチドの内因性機能を「ロックアウト」するために利用される、アンチセンス核酸および「機能不全」(すなわち、上記のポリペプチドに対するコード配列のコード配列内の異種挿入に起因する)である核酸の投与(例えば、以下を参照のこと:Capecchi, 1989, Science 244:1288-1292);または(v)上記ポリペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変更するモジュレーター(すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト(本発明のさらなるポリペプチド模倣物および本発明のペプチドに特異的な抗体を含む))。

#### 【0208】

減少した(疾患または障害に罹患しない被検体に比較して)レベルまたは生物学的活性によって特徴づけられる疾患および障害は、活性を増加する(すなわち、アゴニストである)治療剤で処置され得る。活性を上方制御する治療剤は、治

療または予防の様式で投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：上記ポリペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ；あるいはバイオアベイラビリティを増加させるアゴニスト。

#### 【0209】

増加または減少したレベルは、ポリペプチドおよび/もしくはRNAを定量すること、患者組織サンプル（例えば、生検組織）を入手すること、およびインビトロでRNAまたはペプチドレベル、発現されたポリペプチド（または上記ポリペプチドのmRNAの）構造および/もしくはについてそれをアッセイすることによって容易に検出され得る。当該分野において周知の方法としては以下が挙げられるがそれらに限定されない：免疫アッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、免疫沈降に続きドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学など）および/またはmRNAの発現を検出するハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）。

#### 【0210】

（予防方法）

1つの局面において、本発明は、被検体において、異常なBLAA発現または活性に関連する疾患または障害を予防するための方法を提供する。この方法は、その被検体に、BLAA発現または少なくとも1つのBLAA活性を調節する因子を投与することによる。異常なBLAA発現または活性によって生じるかまたはそれに帰される疾患の危険にある被検体は、例えば、本明細書において記載される診断または予後アッセイのいずれかまたはその組合せによって同定され得る。予防因子の投与は、BLAA異常に特徴的な症状の発症の前に行われ得、その結果、疾患または障害が予防され、あるいはその進行が遅延される。BLAA依存の型に依存して、例えば、BLAAアゴニストまたはBLAAアンタゴニストの因子が、その被検体を処置するために使用され得る。適切な因子は、本明細書において記載されるスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。本発明の予防方法は、以下の亜節においてさらに考察される。

## 【0211】

## (治療方法)

本発明の別の局面は、治療目的のためのB L A A発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、その細胞に関連するB L A Aポリペプチド活性の1つ以上の活性を調節する因子に細胞を接触させる工程を包含する。B L A Aポリペプチド活性を調節する因子は、本明細書に記載されるような因子であり得る(例えば、核酸またはタンパク質、B L A Aポリペプチドの天然に存在する同族リガンド、ペプチド、B L A Aペプチド模倣物あるいは他の低分子)。1つの実施形態において、その因子は、1つ以上のB L A Aポリペプチド活性を刺激する。そのような刺激因子の例としては、活性B L A Aポリペプチドおよびその細胞に導入されたB L A Aをコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、その因子は、1つ以上のB L A Aポリペプチド活性を阻害する。そのような阻害因子の例としては、アンチセンスB L A A核酸分子および抗B L A A抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで実施され得る(例えば、その因子とともにその細胞を培養することによる)、あるいは、インビボで実施され得る(例えば、被検体にその因子を投与することによる)。それ自体、本発明は、B L A Aポリペプチドまたは核酸分子の異常な発現または活性によって特徴づけられる疾患または障害に罹患した個体を処置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、因子(例えば、本明細書において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因子)またはB L A A発現または活性を調節する(例えば、上方制御または下方制御する)因子との組合せで投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、減少したかまたは異常なB L A A発現または活性を補正するための治療として、B L A Aポリペプチドまたは核酸分子を投与する工程を包含する。

## 【0212】

B L A A活性の刺激は、異常に下方制御されるか、および/または増加したB L A A活性が有益な効果を有するようである状況に置いて所望される。1つのそのような状況の例は、被検体が異常な細胞増殖および/または分化(例えば、癌)によって特徴づけられる障害を有する場合である。そのような状況の別の例は

、その被検体が免疫応答関連障害（例えば、自己免疫障害、感染疾患および移植に関連する合併症）を有する場合である。

#### 【0213】

1つの実施形態において、本発明は、哺乳動物における病理学的状態を処置する方法を包含する。この方法は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して少なくとも95%同一であるポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメントの治療量を投与する工程を包含する。代替の実施形態は、BLAAポリペプチド、ならびにそのフラグメント、ホモログ、アナログおよび誘導体に選択的に結合する抗体を被検体に投与する工程を包含する。

#### 【0214】

（治療剤の生物学的効果の決定）

本発明の種々の実施形態において、適切なインビトロまたはインビボアッセイは、特定の治療剤の効果およびその投与が罹患した組織の処置について適応されるかどうかを決定するために利用される。

#### 【0215】

種々の特定の実施形態において、インビトロアッセイは、患者の疾患に關与する型の代表的な細胞を用いて行われて、その細胞型に対して所望の効果を措定の治療剤が発揮するかどうかを判定し得る。適切な動物モデル系（ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどを含むがそれらに限定されない）において、ヒト被検体における試験の前に、治療における使用のための化合物を試験し得る。同様に、インビボ試験のために、当該分野において公知の動物モデル系のいずれかがヒト被検体への投与の前に使用され得る。

#### 【0216】

（悪性腫瘍）

上記のBLAAポリペプチドは、細胞増殖の調節に關与し得る。従って、本発明の治療剤は、細胞過剰増殖および/または細胞増殖の制御の欠失に關連する疾患または障害（例えば、癌、悪性腫瘍および腫瘍）の治療または予防的な処置において有用であり得る。そのような過剰増殖障害の概説について、例えば、以下を参照のこと：Fishman, et al., 1985. MEDICINE,

2nd ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA.

【0217】

本発明の治療剤は、悪性腫瘍および関連する障害を処置または予防するにおける効力を決定するための、当該分野において公知の任意の方法によりアッセイされ得る。そのようなアッセイとしては以下が挙げられるがそれらに限定されない：患者の腫瘍に由来する形質転換した細胞（単数または複数）を利用したインビトロアッセイ、および癌または悪性腫瘍の動物モデルを用いたインビボアッセイ。潜在的に有効な治療剤は、例えば、コントロールに比較して、培養物中の腫瘍由来または形質転換した細胞の増殖を阻害するかまたは動物モデルにおける腫瘍の退行を生じるものである。

【0218】

本発明の実施において、一旦悪性腫瘍または癌が活性を調節（すなわち、阻害、拮抗または活性化（アゴナイズ））することによる処置に受容可能であることが示されると、続いて癌または悪性腫瘍がポリペプチド機能を調節するように働く治療剤の投与によって処置または予防され得る。

【0219】

（臓器移植に関連する疾患）

B L A Aは、臓器移植に関連する障害（特に、臓器拒絶であるがそれに限定されない）と相関づけられている。本発明の治療剤（特に、活性を調節（または供給）するもの）は、臓器移植に関連する疾患または障害を処置または予防するにおいて有効であり得る。本発明の治療剤（特に、上記タンパク質のレベルまたは活性を調節する治療剤）は、臓器移植に関連するそのような疾患および障害を処置または予防するにおける効力についての、当該分野において公知の任意の方法によりアッセイされ得る。そのようなアッセイとしては、以下に記載される細胞培養モデルを用いるためのインビトロアッセイ、または臓器移植に関連した疾患および障害の動物モデルを用いたインビボアッセイ（例えば、以下に記載されるもの）が挙げられる。例えば、潜在的に有効な治療剤は限定する目的ではなく、コントロールに比較して動物モデルにおける免疫拒絶応答を減少させる。

## 【0220】

従って、一旦臓器移植に関連する疾患および障害が、活性の調節による処置に受容可能であることが示されると、そのような疾患または障害は、活性を調節する治療剤の投与によって処置または予防され得る。

## 【0221】

( Tリンパ球増殖および活性化細胞増殖 / 分化活性 )

本発明において開示された B L A A ポリペプチドは、新たな B 7 ファミリーメンバーである。 B 7 ファミリーメンバー ( 例えば、 B 7 - 1 および B 7 - 2 ) は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、そして活性化 T リンパ球に結合し、そして活性化よりも T リンパ球細胞増殖について調節シグナルを提供する。

## 【0222】

( 免疫刺激または抑制活性 )

本発明の B L A A ポリペプチドはまた、免疫刺激または免疫抑制の活性を示し得る。これには、限定ではないが、そのアッセイが本明細書において記載される活性が含まれる。タンパク質は、種々の免疫不全および障害 ( 重症複合免疫不全 ( S C I D ) を含む ) の処置において有用であり得る ( 例えば、 T リンパ球および / または B リンパ球の増殖および増殖を ( 上方または下方 ) 調節するにおいて、ならびに N K 細胞および他の細胞集団の細胞溶解活性を行うことにおいて ) 。これらの免疫不全は、遺伝性であり得るか、あるいはウイルス ( 例えば、 H I V ) および細菌または真菌の感染によって生じ得るか、あるいは自己免疫疾患から生じ得る。より特定すると、ウイルス、細菌、真菌または他の感染によって生じる感染疾患は、本発明のポリペプチドを用いて処置可能であり得、これには、 H I V 、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ミコバクテリア、リーシュマニア種、マラリア種および種々の真菌感染 ( 例えば、カンジダ症 ) による感染が含まれる。当然、この点に関して、本発明のポリペプチドはまた、免疫系が概して所望され得る場合 ( すなわち、癌の処置において ) 有用であり得る。

## 【0223】

本発明のポリペプチドを用いて処置され得る自己免疫疾患は、例えば、結合組

織疾患、多発性硬化症、全身エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、自己免疫肺炎、炎症、ギランバール症候群、自己免疫甲状腺炎、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症、宿主対移植片疾患および自己免疫炎症癌疾患を包含する。本発明のそのようなポリペプチドはまた、喘息（特にアレルギー性喘息）または他の呼吸器の問題のようなアレルギー性反応および状態の処置において有用であるはずであり得る。免疫抑制が所望される他の状態（例えば、臓器移植を含む）もまた、本発明のポリペプチドを用いて処置可能であり得る。

#### 【0224】

本発明のポリペプチドを用いて多数の方法において免疫応答を調節する。下方制御は、すでに免疫応答を阻害もしくはブロックする形態であり得、または免疫応答の誘導を予防することを包含し得る。活性化されたT細胞の機能は、T細胞応答を抑制することか、またはT細胞における特定の寛容を誘導することによって、あるいはそれらの両方によって阻害され得る。T細胞反応の免疫抑制は、概して、活性で、非抗原特異的なプロセスであって、抑制剤に対してT細胞の連続的な暴露を必要とするプロセスである。T細胞における非応答またはエネルギーを誘導することを包含する寛容は、それが概して抗原特異的であり、そして寛容化因子への暴露が停止された後にも維持されるという点において免疫抑制とは識別され得る。機能的には、寛容は、寛容化因子の非存在下で特定の抗原に対して再暴露することに際しT細胞応答の欠如によって実証され得る。

#### 【0225】

1つ以上の抗原機能（制限なしに、Bリンパ球抗原機能（例えば、B7など））を下方制御することまたは予防すること（例えば、活性化されたT細胞によって高レベルのリンホカイン合成を妨害すること）は、組織、皮膚および臓器移植ならびに宿主対移植片疾患（GVHD）の状況において有用である。例えば、T細胞機能の遮断は、組織移植における減少した組織破壊を生じるはずである。代表的には、組織移植において、移植片の拒絶は、それがT細胞によって外来と認識されることによって始まり、続いて、その移植片を破壊する免疫反応が生じる。B7リンパ球抗原と免疫細胞上のその天然のリガンドとの相互作用を阻害またはブロックする分子（例えば、可溶性で単量体形態の、B7-2活性を有するペ

プチド単独、または別のBリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-3）の活性を有する、単量体形態のペプチドまたはブロック抗体との組合せでの、移植前の投与は、対応する同時刺激シグナルを伝達することなしに、免疫細胞に対する天然のリガンドの分子の結合を生じ得る。この問題においてBリンパ球抗原機能をブロックすることは、免疫細胞（例えば、T細胞）によるサイトカイン合成を妨害し、そして従って、免疫抑制因子として作用する。さらに、同時刺激の欠如はまた、T細胞の活性化に十分であり得、それにより、被検体における寛容を誘導し得る。Bリンパ球抗原ブロック試薬による長期の寛容の誘導は、これらのブロック試薬の反復投与の必要性を回避し得る。被検体における十分な免疫抑制または寛容を達成するために、Bリンパ球抗原の機能をブロックすることもまた必要であり得る。

#### 【0226】

臓器移植拒絶またはGVDHを予防するにおける特定のブロック試薬の効力は、ヒトにおける効力を予測する動物モデルを用いて評価され得る。使用され得る適切な系の例は、ラットにおける同種異系心臓移植片およびマウスにおける異種膵臓島細胞移植片を包含する。これらの両者は、以下に記載されるようなインビボでのCTLA4Ig融合タンパク質の免疫抑制効果を試験するために使用されてきている：Lenschow et al., Science 257:789-792 (1992) およびTurka et al., Proc Natl Acad Sci USA, 89:11102-11105 (1992)。さらに、GVDHのマウスモデル（以下を参照のこと：Paul ed. FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-847）を使用して、その疾患の発症におけるインビボでのBリンパ球抗原機能の効果を決定し得る。

#### 【0227】

抗原機能をブロックすることはまた、自己免疫疾患を処置するために治療上で有用であり得る。多くの自己免疫障害は、自己の組織に対して反応性であり、かつ、疾患の病理に関与するサイトカインおよび自己抗体の生成を促進するT細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性T細胞の活性化の予防は、疾患症状

を減少または除去し得る。Bリンパ球抗原のレセプター：リガンドの相互作用を破壊することによってT細胞の同時刺激をブロックする試薬の投与は、T細胞活性化を阻害するために使用され得、そしてその疾患のプロセスに関与し得る自己抗体またはT細胞由来サイトカインの生成を予防するために使用され得る。さらに、ブロック試薬は、その疾患からの長期緩和を導き得る自己反応性T細胞の抗原特異的な寛容を誘導し得る。自己免疫障害を予防または軽減するにおけるブロック試薬の効力は、ヒト自己免疫疾患の多数の十分に特徴づけられた動物モデルを用いて判定され得る。例としては、マウス実験自己免疫脳炎、MRL/lpr/lprマウスまたはNZBハイブリッドマウスにおける全身エリテマトーデス、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBマウスにおける糖尿病、ならびにマウス実験重症筋無力症（以下を参照のこと：Paul ed. , FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Raven Press, New York, 1989, pp. 840 - 856）。

#### 【0228】

免疫応答を上方制御する手段としての、抗原機能（好ましくは、Bリンパ球抗原機能）の上方制御もまた、治療において有用であり得る。免疫応答の上方制御は、既存の免疫応答を増強するか、または初期免疫応答を惹起する形態であり得る。例えば、Bリンパ球抗原機能を刺激することにより免疫応答を惹起することは、ウイルス感染の場合において有用であり得る。さらに、全身ウイルス疾患（例えば、インフルエンザ、通常の風邪、および脳炎）は、Bリンパ球抗原の刺激形態の全身投与によって軽減され得る。

#### 【0229】

あるいは、抗ウイルス免疫応答は、患者からT細胞を取り出すこと、本発明のペプチドを発現するか、本発明の可溶性ペプチドの刺激形態が一緒にあるかのいずれかのウイルス抗原パルス刺激されたARCを用いてインビトロでT細胞を同時刺激すること、およびその患者にインビトロで活性化されたT細胞を再導入することによって、感染した患者において増強され得る。抗ウイルス免疫応答を増強する別の方法は、患者から感染した細胞を単離すること、本明細書に記載されるような本発明のタンパク質をコードする核酸でそれらをトランスフェクトし、

その結果その細胞がそのタンパク質のすべてまたは一部を細胞表面上に発現すること、およびトランスフェクトされた細胞をその患者に再導入することである。感染した細胞は、今度は、インビボでT細胞へ動じ刺激シグナルを送達し得、それゆえ活性化し得る。

#### 【0230】

別の適用において、抗原機能（好ましくは、Bリンパ球抗原機能）の上方制御または増強は、腫瘍免疫の誘導において有用であり得る。本発明の少なくとも一つのペプチドをコードする核酸でトランスフェクトした腫瘍細胞（例えば、肉腫、黒色腫、リンパ腫、白血病、神経芽腫、癌腫）は、被検体における腫瘍特異的な寛容を克服するためにその被検体に投与され得る。所望の場合、腫瘍細胞は、ペプチドの組合せを発現するようにトランスフェクトされ得る。例えば、患者から得られた腫瘍細胞は、B7-2様活性単独を有するペプチド、またはB7-1様活性および/もしくはB7-3様活性を有するペプチドと組み合わせでの発現を指向する、発現ベクターでエキソビボでトランスフェクトされ得る。トランスフェクトされた腫瘍細胞は、患者に戻されて、トランスフェクトされた細胞の表面上にペプチドの発現を生じる。あるいは、遺伝子治療技術を用いて、インビボでトランスフェクションについて腫瘍細胞を標的化し得る。

#### 【0231】

腫瘍細胞の表面上のBリンパ球抗原の活性を有する本発明のペプチドの存在は、T細胞に対して必要な同時刺激を提供して、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対してT細胞媒介免疫応答を誘導する。さらに、MHCクラスIまたはMHCクラスIIの分子を欠如するか、またはMHCクラスIまたはMHCクラスIIの分子の十分量を再発現しない腫瘍細胞は、MHCクラスI鎖タンパク質および<sub>2</sub>ミクログロブリンタンパク質、もしくはMHCクラスII鎖タンパク質およびMHCクラスII鎖タンパク質のすべてまたは一部（例えば、細胞質ドメイン短縮部分）をコードする核酸でトランスフェクトされ、そにより、MHCクラスIまたはMHCクラスIIのタンパク質を細胞表面上に発現する。Bリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-2、B7-3）と組み合わせた適切なクラスIまたはクラスIIの発現は、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細

胞媒介免疫応答を誘導する。必要に応じて、MHCクラスII関連タンパク質(不変鎖)の発現をブロックするアンチセンス構築物をコードする遺伝子はまた、Bリンパ球の活性を有するペプチドをコードするDNAとともに同時トランスフェクトされて、腫瘍関連抗原の提示を促進し得、そして腫瘍特異的免疫を誘導し得る。従って、ヒト被検体におけるT細胞媒介免疫応答の誘導は、その被検体における腫瘍特異的寛容を克服するに十分であり得る。

### 【0232】

本発明のポリペプチドの活性は、とりわけ、以下の方法によって測定され得る：甲状腺細胞または脾臓細胞の細胞傷害性についての適切なアッセイとしては、以下において記載されるものが挙げられるがそれらに限定されない：CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coligan et al., eds. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, Chapter 7); Herrmann et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann et al., J Immunol 128:1968-1974, 1982; Handa et al., J Immunol 135:1564-1572, 1985; Takai et al., J Immunol 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J Immunol 140:508-512, 1988; Herrmann et al., Proc Natl Acad Sci USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann et al., J Immunol 128:1968-1974, 1982; Handa et al., J Immunol 135:1564-1572, 1985; Takai et al., J Immunol 137:3494-3500, 1986; Bowman et al., J Virology 61:1992-1998; Takai et al., J Immunol 140:508-512, 1988; Bertagnolli et al., Cell Immunol 133:327-341, 1991; Brown et al., J Immunol 15

3 : 3079 - 3092 , 1994。

【0233】

T細胞依存性免疫グロブリン応答およびアイソタイプスイッチングについてのアッセイ(これは、とりわけT細胞依存性抗体応答を調節し、そしてTh1/Th2プロファイルに影響を与えるタンパク質を同定する)としては、限定することなく、以下に記載されるものが挙げられる: Maliszewski, J Immune 144:3028-3033, 1990; および Mond and Brunswick, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coligan et al., (eds.) Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto 1994。

【0234】

混合リンパ球反応(MLR)アッセイ(これは、とりわけ、Th1およびCTL反応を主に生じるタンパク質を同定する)は、限定することなく、以下に記載されるものが挙げられる: CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. Coligan et al., eds. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, Chapter 7); Takai et al., J Immunol 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J Immunol 140:508-512, 1988; Bertagnolli et al., J Immunol 149:3778-3783, 1992。

【0235】

樹状細胞依存性アッセイ(これは、とりわけ、未刺激(naive)T細胞を活性化する樹状細胞により発現されるタンパク質を同定する)としては、限定することなく、以下に記載されるものが挙げられる: Guery et al., J Immunol 134:536-544, 1995; Inaba et al., J Exp Med 173:549-559, 1991; Macatonia et al., J Immunol 154:5071-5079,

1995; Porgador et al., J Exp Med 182:255-260, 1995; Nair et al., J Virol 67:4062-4069, 1993; Huang et al., Science 264:961-965, 1994; Macatonia et al., J Exp Med 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj et al., J Clin Invest 94:797-807, 1994; および Inaba et al., J Exp Med 172:631-640, 1990。

【0236】

リンパ球生存/アポトーシスについてのアッセイ(これは、超抗原誘導の後のアポトーシスを妨害するタンパク質およびリンパ球恒常性を調節するタンパク質を同定する)としては、限定することなく、以下に記載されるものが挙げられる: Darzynkiewicz et al., Cytometry 13:795-808, 1992; Gorczyca et al., Leukemia 7:659-670, 1993; Gorczyca et al., Cancer Res 53:1945-1951, 1993; Itoh et al., Cell 66:233-243, 1991; Zacharchuk, J Immunol 145:4037-4045, 1990; Zamai et al., Cytometry 14:891-897, 1993; Gorczyca et al., Internat J Oncol 1:639-648, 1992。

【0237】

T細胞運命付けおよび発生の初期工程に影響を与えるタンパク質についてのアッセイとしては、限定することなく、以下に記載されるものが挙げられる: Antica et al., Blood 84:111-117, 1994; Fine et al., Cell Immunol 155:111-122, 1994; Galy et al., Blood Toki et al., Proc Nat Acad Sci USA 88:7548-7551, 1991。

## 【0238】

(他の活性)

本発明のポリペプチドはまた、以下のさらなる活性または効果の1つ以上を示し得る：感染因子（これには、限定することなく、細菌、ウイルス、真菌および他の寄生生物）の増殖、感染または機能の阻害、あるいはその殺傷；身体の特徴（限定することなく、身長、体重、髪の色、目の色、皮膚、肥満対痩身比率または他の組織色素、あるいは器官または身体の部分のサイズまたは形状（例えば、豊胸または胸の縮小、骨形態または形状における変更））をもたらす（抑制または増強すること）；バイオリズムまたは循環サイクルあるいはリズムをもたらすこと；雄性または雌性の被検体の繁殖力をもたらすこと；食餌性脂肪、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子または他の栄養因子あるいは成分の代謝、異化、プロセッシング、利用、貯蔵または除去；行動特性（限定することなく、食欲、性欲、ストレス、認知（認知障害を含む）、抑鬱（抑鬱障害を含む）および暴力行動ヲ含む）をもたらすこと；鎮痛効果または他の疼痛減少効果を提供すること；造血系統以外の系統における胚性幹細胞の分化および増殖を促進すること；ホルモン性または内分泌活性；酵素の場合、その酵素の欠損を補正し、そして欠損関連疾患を処置すること；過剰増殖障害（例えば、乾癬など）の処置；免疫グロブリン様活性（例えば、抗原または補体に結合する能力など）；ならびに、そのようなタンパク質または別の物質に対する免疫応答を惹起するワクチン組成物において抗原またはそのようなタンパク質と交叉反応性である存在物として作用する能力。

## 【0239】

本発明は、本明細書において記載される特定の実施形態によって範囲が限定されるべきではない。実際、本明細書において記載されるものに加えて本発明の種々の改変は、上記説明および付随する図から当業者に明白である。そのような改変は、添付の特許請求の範囲内にはいることが意図される。

## 【0240】

本願を通じて引用されるすべての参考文献、特許および公開された特許出願の内容は、本明細書において参考として援用される。

## 【0241】

(等価物)

本発明は、その詳細な説明に関連して記載しており、上記の説明は、本発明の範囲の例示でありそして限定を意図せず、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲の範囲によって規定されることが理解されるべきである。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。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は、2691ヌクレオチドヒトcDNA配列(配列番号1)、およびそのコードされるポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

## 【図2】

図2は、2885ヌクレオチドヒトcDNA配列(配列番号3)、およびそのコードされるポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

## 【図3】

図3は、2229ヌクレオチドヒトcDNA配列(配列番号5)、およびそのコードされるポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号6)を示す。

## 【図4】

図4は、いくつかの相同なB7タンパク質と比較される配列番号6のBLAAポリペプチドのClustalWアライメントを示し、そして暗く強調表示することによって保存領域を、そして明るく強調表示することによって保存アミノ酸置換を示す。

## 【図5】

図5は、配列番号6のポリペプチドについての疎水性プロットを示す。

【図1】

番附記されたタンパク質-7-4:3-ヌクレオチド111~1130

mz5004\_vh.seq 長さ: 2691 24/Aug/1999

1 GCGGCCGCGTGACCATCACGTGCTCCAGCTACCAGGGCTACCCCTG  
 46 AGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGCTGTGCCCCCTCACTG  
 91 GCAACGTGACCACGTGCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTGTGTG  
 MetAlaAsnGluGlnGlyLeuPheA  
 136 ATGTGCACAGCATCCTGCGGGTGGTGTCTGGGTGCAAATGGCACCT  
 spValHisSerIleLeuArgValValLeuGlyAlaAsnGlyThrT  
 181 ACAGCTGCCTGGTGGCAACCCCGTGTGCTGCAGCAGGATGCCGACA  
 yrSerCysLeuValArgAsnProValLeuGlnGlnAspAlaHisS  
 226 GCTCTGTCAACATCACACCCAGAGAAGCCCCACAGGAGCCGTGG  
 erSerValThrIleThrProGlnArgSerProThrGlyAlaValG  
 271 AGGTCCAGGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCG  
 luValGlnValProGluAspProValValAlaLeuValGlyThrA  
 316 ATGCCACCCCTGCACCTGCTCCTTCTCCCCGAGCCTGGCTTCAGCC  
 spAlaThrLeuHisCysSerPheSerProGluProGlyPheSerL  
 361 TGACACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACAGACACCAAACAGC  
 euThrGlnLeuAsnLeuIleTrpGlnLeuThrAspThrLysGlnL  
 406 TGGTGACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCGGGCAGCGCCTATG  
 euValHisSerPheThrGluGlyArgAspGlnGlySerAlaTyrA  
 451 CCAACCGCACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATG  
 laAsnArgThrAlaLeuPheProAspLeuLeuAlaGlnGlyAsnA  
 496 CATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCCTGTGGCGGACGAGGGCAGCT  
 laSerLeuArgLeuGlnArgValArgValAlaAspGluGlySerP  
 541 TCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTCGGCAGCGCTGCCGTCA  
 heThrCysPheValSerIleArgAspPheGlySerAlaAlaValS  
 586 GCCTGCAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCCTGG  
 erLeuGlnValAlaAlaProTyrSerLysProSerMetThrLeuG  
 631 AGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGGTGACCATCACGT  
 luProAsnLysAspLeuArgProGlyAspThrValThrIleThrC  
 676 GCTCCAGCTACCGGGGCTACCCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGG  
 ysSerSerTyrArgGlyTyrProGluAlaGluValPheTrpGlnA  
 721 ATGGGCAGGGTGTGCCCTGACTGGCAACGTGACCAGTCCGAGA  
 spGlyGlnGlyValProLeuThrGlyAsnValThrThrSerGlnM  
 766 TGGCCAACGAGCAGGGCTGTGTTGATGTGCACAGCCTCCTGCGGG  
 etAlaAsnGluGlnGlyLeuPheAspValHisSerValLeuArgV

【図1-1】

811 TGGTGTGGGTGCCAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGGCACC  
alValLeuGlyAlaAsnGlyThrTyrSerCysLeuValArgAsnP

856 CCGTGTGCAGCAGGATGCGCACGGCTCTGTACCATCACAGGGC  
roValLeuGlnGlnAspAlaHisGlySerValThrIleThrGlyG

901 AGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGGC  
lnProMetThrPheProProGluAlaLeuTrpValThrValGlyL

946 TCTCTGTCTGTCTCATTGCCTGCTGGTGGCCCTGGCTTTCGTGT  
auSerValCysLeuIleAlaLeuLeuValAlaLeuAlaPheValC

991 GCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGAATGCAGGAG  
ysTrpArgLysIleLysGlnSerCysGluGluGluAsnAlaGlyA

1036 CCGAGGACCAGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGC  
laGlnAspGlnAspGlyGlnGlyGluGlySerLysThrAlaLeuG

1081 AGCCTCTGAAACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAA  
lnProLeuLysHisSerAspSerLysGluAspAspGlyGlnGluI

1126 TAGCCTGACCATGAGGACCAGGGAGCTGCTACCCCTCCCTACAGC  
leAla

1171 TCCTACCCCTCTGGCTGCAATGGGGCTGCACTGTGAGCCCTGCCCC  
1216 CAACAGATGCATCCTGCTGTGACAGGTGGGCTCCTTCTCCAAGG  
1261 ATGCCGATACACAGACCACTGTGCAGCCTTATTTCTCCAATGGACA  
1306 TGATTCCCAGTCATCCTGCTGCCTTTTTTCTTATAGACACAATG  
1351 AACAGACCACCCACAACCTTAGTTCTCTAAGTCATCCTGCCTGCT  
1396 GCCTTATTTACAGTACATACATTTCTTAGGGACACAGTACACTG  
1441 ACCACATCACCACCCTCTTCTTCCAGTGTGCGTGGACCATCTGG  
1486 CTGCCTTTTTTCTCCAARGATGCAATATTCAGACTGACTGACCC  
1531 CCTGCCTTATTTACCCAAGACACGATGCAATAGTCACCCCGGCCT  
1576 TGTTTTCTCCAATGCCCGTATACACTAGTGATCATGTTGAGCCCT  
1621 GCTTCCACCTGCATAGAATCTTTCTTCTCAGACAGGGACAGTGC  
1666 GGCCCTCAACATCTCTGGAGTCTAGAAGCTGTTTTCTTTCCCTC  
1711 CTFCTCCTCTTNGCTCTAGCCTTAATACTGGCCTTTCCCTCCCT  
1756 GCCCCAAGTGAAGACAGGGCACTCTGCGCCACCACATGCACAGC  
1801 TGTCCATGGAGACCTGCAGGTGCACGTGCTGGAACACGTGTGGTT  
1846 CCCCCCTGGCCAGCCTCCTCTGCAGTGCCTCCTCCCTGCCCA  
1891 TCCTCCCCACGGAGCATTGTGCTGGTCAACTGGTTCTCCAGGGG  
1936 TCTGTGATGGGGCCCCCTGGGGGTGAGCTTCTGTCCCTCTGCCTTC  
1981 TCACCTCTPPGTTCTTFFCTTTTCATGATCCATTGAGTTGATGT  
2026 TTATTGAGCAACTACAGATGTCAGCACTGTGTTAGGTGCTGGGGG  
2071 CCGTGGTGGGAGATAAAGTTCTTCCCTCAAGGACTCCCATCC  
2116 AGCTGGGAGACAGACAACCTAACTACACTGCACCCCTGGGTTTGCA  
2161 GGGGGCTCCTGCCTGGCTCCCTGCTCCACACCTCCTCTGTGGCTC  
2206 AAGGCTTCTGGATACTTCACCCCATCCCACCCATAATTCTTAC  
2251 CCAGAGCATGGGGTTGGGGCGGAACCTGGAGAGAGGGACATAGC  
2296 CCTCGCCACGGCTAGAGAACTGGTGGTGTCCAAAATGTCTGTC  
2341 CAGGTGTGGCCAGGTGGGCAGGCACCAAGGCCCTCTGGACCTTTC  
2386 ATAGCAGCAGAAAGGCAGAGCCTGGGGCAGGGCAGGGCCAGGAA  
2431 TGCTTTGGGGACACCGAGGGGACTGCCCCCCACCCCCACCATGGT  
2476 GCTATTCTGGGGCTGGGGCAGTCTTTCCTGGCTTGCCTCTGGCC  
2521 AGCTCCCGSCTCTGGTAGAGTGAGACTTCAGACGTTCTGATGCC

図1-1の続き

【図1-2】

2566 TTCCGGATGTCATCTCTCCCTGCCCCAGGAATGGAGATGTGAGG  
2611 ACTTCTAATTAAATGTGGGACTCGGAGGGATTTGTAAACTGG  
2656 GGTATATTTTGGGAAATAAATGTCTTTGTAAAA

図1つぎ

【図2】

翻訳されたタンパク質-フレーム: 2-ヌクレオチド 2~1324

Mz5004 12/16/99

1  
CCCTCTCCCGGACCTGCTGGCACAGGGCAACGCATCCCTGAGGC  
ProLeuProGlyProAlaGlyThrGlyGlnArgIleProGluAl

46  
TGCAGCGCGTGCCTGTAGCGGACGAGGGCCAGCTTCACCTGCTTCG  
aAlaAlaArgAlaCysSerGlyArgGlyGlnLeuHisLeuLeuAr

91  
TGAGCATCCGGGATTTCCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTGCAGGTGG  
gGluHisProGlyPheArgGlnArgCysArgGlnProAlaGlyGl

136  
CCGCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATGACCCTGGAGCCCAACAAGG  
yArgSerLeuLeuGluAlaGlnHisAspProGlyAlaGlnGlnGl

181  
ACCTGCGGCCAGGGGACACGGTGTGACCCATCACGTGCTCCAGCTA  
yProAlaAlaArgGlyHisGlyValThrIleThrCysSerSerTy

226  
CCAGGGCTACCCTGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGCCAGGG  
rGlnGlyTyrProGluAlaGluValPheTrpGlnAspGlyGlnGl

271  
TGTGCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTCCAGATGGCCCAACGA  
yValProLeuThrGlyAsnValThrThrSerGlnMetAlaAsnGl

316  
GCAGGGCTTGTGATGTGCACAGCATCCTGCGGGTGGTCTGGG  
uGlnGlyLeuPheAspValHisSerIleLeuArgValValLeuGl

361  
TGCAAATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGGCAACCCCGTGTGCA  
yAlaAsnGlyThrTyrSerCysLeuValArgAsnProValLeuGl

406  
GCAGGATGCGCACAGCTCTGTACCATCACACCCAGAGAAGCCC  
nGlnAspAlaHisSerSerValThrIleThrProGlnArgSerPr

451  
CACAGGACCCCTGGAGGTCCAGTCCCTGAGGACCCGGTGGTGGC  
oThrGlyAlaValGluValGlnValProGluAspProValValAl

496  
CCTAGTGGGCACCGATGCCACCTGCACTGCTCCTTCTCCCCGA  
aLeuValGlyThrAspAlaThrLeuHisCysSerPheSerProGl

541  
GCCTGGCTTCAGCCTGACACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGAC  
uProGlyPheSerLeuThrGlnLeuAsnLeuIleTrpGlnLeuTh

586  
AGACACCAACAGCTGGTGCACAGTTTCACCGAAGGCCGGGACCA  
rAspThrLysGlnLeuValHisSerPheThrGluGlyArgAspGl

631  
GGGCAGCGCCTATGCCAACCGCACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCT  
nGlySerAlaTyrAlaAsnArgThrAlaLeuPheProAspLeuLe

676  
GGCACAAGGCAATGCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGGTGGC  
uAlaGlnGlyAsnAlaSerLeuArgLeuGlnArgValArgValAl

721  
GGACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTTCCGG  
aAspGluGlySerPheThrCysPheValSerIleArgAspPheGl

【図2-1】

766 CAGCCCTGCCGTCAGCCTGCAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCC  
ySerAlaAlaValSerLeuGlnValAlaAlaProTyrSerLysPr  
811 CAGCATGACCCCTGGAGCCCAACAAGGACCTGCGGCCAGGGGACAC  
oSerMetThrLeuGluProAsnLysAspLeuArgProGlyAspTh  
856 GGTGACCATCACGTGCTCCAGCTACCGGGGCTAGCCCTGAGGCTGA  
rValThrIleThrCysSerSerTyrArgGlyTyrProGluAlaGl  
901 GGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGGGTGTGCCCTGACTGGCAACGT  
uValPheTrpGlnAspGlyGlnGlyValProLeuThrGlyAsnVa  
946 GACCACGTCCGAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCA  
lThrThrSerGlnMetAlaAsnGluGlnGlyLeuPheAspValHi  
991 CAGCGTCTGCGGGTGGTGTGCTGGGTGCGAATGGCACCTACAGCTG  
sSerValLeuArgValValLeuGlyAlaAsnGlyThrTyrSerCy  
1036 CCTGGTGGCAACCCCGTGTGCTGCAGCAGGATGCCACGGCTCTGT  
sLeuValArgAsnProValLeuGlnGlnAspAlaHisGlySerVa  
1081 CACCATCACAGGGCAGCCTATGACATTCCCCCAGAGGCCCTGTG  
lThrIleThrGlyGlnProMetThrPheProProGluAlaLeuTr  
1126 GGTGACCGTGGGGCTCTCTGTCTGTCTCATTGCACCTGCTGGTGGC  
pValThrValGlyLeuSerValCysLeuIleAlaLeuLeuValAl  
1171 CCTGGCTTTCGTGTGCTGGAGAAAGATCAAACAGAGCTGTGAGGA  
aLeuAlaPheValCysTrpArgLysIleLysGlnSerCysGluGl  
1216 GGAGAATGCAGGAGCCGAGGACCAGGATGGGGAGGGGAAGGCTC  
uGluAsnAlaGlyAlaGluAspGlnAspGlyGlnGlyGluGlySe  
1261 CAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGAAACACTCTGACAGCIAAGAAGA  
rLysThrAlaLeuGlnProLeuLysHisSerAspSerLysGluAs  
1306 TGATGGACAAGAAATAGCCTGACCATGAGCACCAGGGAGCTGCTA  
pAspGlyGlnGluIleAla  
1351 CCCCTCCCTACAGCTCCTACCCCTCTGGCTGCAATGGGGCTGCACT  
1396 GTGAGCCCTGCCCCCAACAGATGCATCCTGCTCTGACAGGTGGGC  
1441 TCCTTCTCCAAGGATGCGATACACAGACCCTGTGCAGCCTTAT  
1486 TTCTCCAATGGACATGATTCCCAAGTCATCCTGCTGCCMTTTTTTC  
1531 TTATAGACACAATGAACAGACCACCCACAACCTTACTCTTAAG  
1576 TCATCCTGCTGCTGCTGCTTATTTACAGTACATACATTTCTTAGG  
1621 GACACAGTACACTGACCACATCACCACCCTCTTCTTCCAGTGCTG  
1666 CGTGGACCATCTGGCTGCCCTTTTTTCTCCAAAGATGCAATATTC

図2-1

【図2-2】

1711 AGACTGACTGACCCCCCTGCCTTATTTACCCAAAGACACCGATGCAT  
1756 AGTCACCCCGGCCCTTGTFTCTCCAATGGCCGTGATACTAGTGA  
1801 TCATGTTGAGCCCTGCTTCCACCTGCATAGAATCTTTTCTTCTCA  
1846 GACAGGGACAGTGCGGCCTCAACATCTCCTGGAGTCTAGAAGCTG  
1891 TTTCCTTTCCCTCCTTCCTCCTCTGCTCTAGCCTTAATACTGG  
1936 CCTTTTCCCTCCCTGCCCAAGTGAAGACAGGGCACTCTGCGCC  
1981 ACCACATGCACAGCTGTGCATGGAGACCTGCAGGTGCACGTGCTG  
2026 GAACACGTGTGGTTCCCCCTGGCCAGCCTCCTCTGCAGTGCCT  
2071 CTCTCCCCTGCCCATCCTCCCCACGGGAGCATGTGCTGGTCCAC  
2116 TGGTTCTCCAGGGGTCTGTGATGGGGCCCTGGGGGTGAGCTTCT  
2161 GTCCCTCTGCCTTCTCACCTCTTTGTTCCCTTTCTTTTCATGTATC  
2206 CATTGAGTTGATGTTTATTGAGCAACTACAGATGTCAGCACTGTG  
2251 TTAGGTGCTGGGGCCCTGCGTGGGAAGATAAAGTTCCTCCCTCA  
2296 AGGACTCCCCATCCAGCTGGGAGACAGACAACACTACTACTGCA  
2341 CCCCAGGGTTTGCAGGGGCTCCTGCCTGGCTCCCTGCTCCACAC  
2386 CTCTCTGTGGCTCAAGGCTTCCTGGATACCTCACCCCCATCCCA  
2431 CCCATAATCTTACCCAGAGCATGGGGTTGGGGCGGAAACCTGGA  
2476 GAGAGGGACATAGCCCTCGCCACGGCTAGAGAACTGAGTGGTGT  
2521 CCAAATGCTCTGTCCAGGTGTGGGCAGGTGGGCAGGCACCAAGGC  
2566 CCTCTGGACCTTTCTATAGCAGCAGAAAAGGCAGAGCCTGGGGCAG  
2611 GGCAGGGCCAGGAATGCTTTGGGGACACCGAGGGGACTGCCCCC  
2656 ACCCCCACCATGGTGCTTATTCTGGGGCTGGGGCAGTCTTTTCTG  
2701 GCTTGCCTCTGGCCAGCTCCCGCCCTCTGGTAGAGTGAGACTTCA  
2746 GACGTCTGATGCCTTCCGGATGTCATCTCTCCCTGCCCCAGGAA  
2791 TGGAAGATGTGAGGACTTCTAATTTAAATGTGGGACTCGGAGGGA  
2836 TTTTGTAACTGGGGGATATTTGGGGAAAATAAATGCTTTTGT  
2881 AAAAA

図2フキ

## 【図3】

翻訳されたタンパク質534アミノ酸-7-4:3-771残 60~1661  
2/14/00

```

1      GCGGCCCGGGGCGAGCCCTCCACCACGGGGAGCCCAGCTGTCAGC
46     CGCCTCACAGGAAGATGCTGCGTCGGCGGGGCGAGCCCTGGCATGG
           MetLeuArgArgArgGlySerProGlyMetG
91     GTGTGCATGTGGGTGCAGCCCTGGGAGCACTGTGGTCTGCCTCA
           lyValHisValGlyAlaAlaLeuGlyAlaLeuTrpPheCysLeuT
136    CAGGAGCCCTGGAGGTCCAGGTCCCTGAAGACCCAGTGGTGGCAC
           hrGlyAlaLeuGluValGlnValProGluAspProValValAlaL
181    TGGTGGGCACCGATGCCACCCTGTGCTGCTCCCTTCCCTGAGC
           euValGlyThrAspAlaThrLeuCysCysSerPheSerProGluP
226    CTGGCTTCAGCCTGGCACAGCTCAACCTCATCTGGCAGCTGACAG
           roGlyPheSerLeuAlaGlnLeuAsnLeuIleTrpGlnLeuThra
271    ATACCAAACAGCTGGTGCACAGCTTTGCTGAGGGCCAGGACCAGG
           spThrLysGlnLeuValHisSerPheAlaGluGlyGlnAspGlnG
316    GCAGCGCCTATGCCAACCGCACGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGG
           lySerAlaTyrAlaAsnArgThrAlaLeuPheProAspLeuLeuA
361    CACAGGGCAACGCATCCCTGAGGCTGCAGCGCGTGCCTGTGGCGG
           laGlnGlyAsnAlaSerLeuArgLeuGlnArgValArgValAlaA
406    ACGAGGGCAGCTTCACCTGCTTCGTGAGCATCCGGGATTCCGGCA
           spGluGlySerPheThrCysPheValSerIleArgAspPheGlyS
451    GCGCTGCCGTCAGCCTGCAGGTGGCCGCTCCCTACTCGAAGCCCA
           erAlaAlaValSerLeuGlnValAlaAlaProTyrSerLysProS
496    GCATGACCCCTGGAGCCCAACAGGACCTGCGGCCAGGGGACACGG
           erMetThrLeuGluProAsnLysAspLeuArgProGlyAspThrV
541    TGACCATCACGCTCCAGCTACCAGGGCTACCTGAGGCTGAGG
           alThrIleThrCysSerSerTyrGlnGlyTyrProGluAlaGlnV
586    TGTTCGGCAGGATGGGCAGGGTGTGCCCTGACTGGCAACCTGA
           alPheTrpGlnAspGlyGlnGlyValProLeuThrGlyAsnValT
631    CCACGTCGCAGATGGCCAACGAGCAGGGCTTGTTTGATGTGCACA
           hrThrSerGlnMetAlaAsnGluGlnGlyLeuPheAspValHisS
676    GCATCCTGCGGGTGGTGTCTGGGTGCAATGGCACCTACAGCTGCC
           erIleLeuArgValValLeuGlyAlaAsnGlyThrTyrSerCysL
721    TGGTGGCCACCCCGTGTCTGCAGCAGGATGCGCACAGCTCTGTCA
           auValArgAsnProValLeuGlnGlnAspAlaHisSerSerValT

```

【図3-1】

766 CCATCACACCCCAGAGAAGCCCCACAGGAGCCGTGCAGGTCCAGG  
hrIleThrProGlnArgSerProThrGlyAlaValGluValGlnV

811 TCCCTGAGGACCCCGGTGGTGGCCCTAGTGGGCACCGATGCCACCC  
alProGluAspProValValAlaLeuValGlyThrAspAlaThrL

856 TGGCTGCTCCTTCTCCCCGAGCCTGGCTTCAGCCTGGCACAGC  
euArgCysSerPheSerProGluProGlyPheSerLeuAlaGlnL

901 TCAACCTCATCTGGCAGCTGACAGACACCAACAGCTGGTGCACA  
euAsnLeuIleTrpGlnLeuThrAspThrLysGlnLeuValHisS

946 GTTTCACCGAAGGCCGGGACCAGGGCAGCCCTATGCCAACCCGA  
erPheThrGluGlyArgAspGlnGlySerAlaTyrAlaAsnArgT

991 CGGCCCTCTTCCCGGACCTGCTGGCACAAGGCAATGCATCCCTGA  
hrAlaLeuPheProAspLeuLeuAlaGlnGlyAsnAlaSerLeuA

1036 GGCTGCAGCGCGTGCCTGTGGCCGACGAGGGCAGCTTCACCTGCT  
rgLeuGlnArgValArgValAlaAspGluGlySerPheThrCysP

1081 TCGTGAGCATCCGGGATTCGGCAGCGCTGCCGTCAGCCTGCAGG  
heValSerIleArgAspPheGlySerAlaAlaValSerLeuGlnV

1126 TGGCCGCTCCCTACTCGAAGCCCAGCATTGACCCTGGAGCCCAACA  
alAlaAlaProTyrSerLysProSerMetThrLeuGluProAsnL

1171 AGGACCTGCCGCCAGGGGACACGGTGACCATCAGCTGCTCCAGCT  
ysAspLeuArgProGlyAspThrValThrIleThrCysSerSerT

1216 ACCGGGGCTACCCGAGGCTGAGGTGTTCTGGCAGGATGGGCAGG  
yrArgGlyTyrProGluAlaGlnValPheTrpGlnAspGlyGlnG

1261 GTGTGCCCCCTGACTGGCAACGTGACCACGTCCGACAGATGGCCAACG  
lyValProLeuThrGlyAsnValThrThrSerGlnMetAlaAsnG

1306 AGCAGGECTTGTTCGATGTGCACAGCGTCCCTCCGGGTGGTGCCTGG  
luGlnGlyLeuPheAspValHisSerValLeuArgValValLeuG

1351 GTCCGATGGCACCTACAGCTGCCTGGTGGCACAACCCGTGCTGC  
lyAlaAsnGlyThrTyrSerCysLeuValArgAsnProValLeuG

1396 ACCAGGATGCCGACGGCTCTGTCCACCATCACAGGGCAGCCTATGA  
lnGlnAspAlaHisGlySerValThrIleThrGlyGlnProMetT

1441 CATCCCCCAGAGGCCCTGTGGGTGACCGTGGGCTGTCTGTCT  
hrPheProProGluAlaLeuTrpValThrValGlyLeuSerValC

1486 GTCTCATTGCACTGCTGGTGGCCCTGGCTTTCGTGTGCTGGAGAA  
ysLeuIleAlaLeuLeuValAlaLeuAlaPheValCysTrpArgL

1531 AGATCAAACAGAGCTGTGAGGAGGAGATGCAGGAGCTGAGGACC  
ysIleLysGlnSerCysGluGluGluAsnAlaGlyAlaGlnAspG

1576 AGGATGGGGAGGGAGAAGGCTCCAAGACAGCCCTGCAGCCTCTGA  
lnAspGlyGluGlyGluGlySerLysThrAlaLeuGlnProLeuL

図3-1

## 【図3-2】

1621 AACACTCTGACAGCAAAGAAGATGATGGACAAGAAATAGCCTGAC  
ysHisSerAspSerLysGluAspAspGlyGlnGluIleAla  
1656 CATGAGGACCAGGGAGCTGCTACCCCTCCCTACAGCTCCTACCCCT  
1711 CTGGCTGCAATGGGGCTGCACTGTGAGCCCTGCCCCCAACAGATG  
1756 CATCCTGCTCTGACAGGTGGGCTCCTTCTCCAAAGGATGCGATAC  
1801 ACAGACCACTGTGCAGCCCTATTCTCCAAATGGACATGATTCCCA  
1846 AGTCATCCTGCTGCCCTTTTTTCTTATAGACACAATGAACAGACCA  
1891 CCCACAACCTTAGTTCCTCTAAGTCATCCTGCCCTGCTGCCCTTATTT  
1936 CACAGTACATACATTTCTTAGGGACACAGTACACTGACCACATCA  
1981 CCACCCCTCTTCTCCAGTGTGCGTGGACCATCTGGCTGCCCTTTT  
2026 TTCTCCAAAGATGCAATATTCAGACTGACTGACCCCTGCCCTTA  
2071 TTTCACCAAAGACACGATGCATAGTCACCCCGACCTTGTTCCTCC  
2116 AATGGCCGTEATACACTAGTGATCATGTTTCAGCCCTGCTTCCACC  
2161 TGCATAGAATCTTTTCTTCTCAGACAGGGACAGTCCGGCCTCAAC  
2206 ATCTCCTGGAGTCTAGGCGGCCGC

図3-2



【図4-1】

H7-1_HUMAN	LEITGGRWV	QT	AVPTTQKQ	-----	HFEDN	LLPSQALITIS	-----	YAGDQV
Q28499_rhesus_H7-1	LEITGGRWV	QT	AVPTTQKQ	-----	HFEDN	LLPSQALITIS	-----	YAGDQV
H7-1_RABBIT	LEITGGRWV	QI	AVPTTQKQ	-----	EPFID	QLPFDALIPSG	-----	YAGDQV
U57755_cat_H7_1	LEITGGRWV	QI	AVPTTQKQ	-----	QFENN	QLWILDLSSVSGIV	-----	YAGDQV
H7-1_MOUSE	LEITGGRWV	ED	AVPTTQKQ	-----	DFEDS	AVPLVLEFAGNG	-----	YAGDQV
AF157827_cat_H7-2	LEITGGRWV	SL	AVPTTQKQ	-----	KDFEQ	GVYLDALAVV	-----	YAGDQV
aa117297_dog_H7-2	LEITGGRWV	SL	AVPTTQKQ	-----	TEEDG	DEILLDALAVV	-----	YAGDQV
176088-pig_H7-2	LEITGGRWV	SL	AVPTTQKQ	-----	QFVFP	DEILLDALAVV	-----	YAGDQV
u04343_hm_H7-2	LEITGGRWV	SL	AVPTTQKQ	-----	EPF	DEILLDALAVV	-----	YAGDQV
P42082_mus_H7_2	LEITGGRWV	SL	AVPTTQKQ	-----	EPF	DEILLDALAVV	-----	YAGDQV
aac52336_mus_H7-2_alt.spl	LEITGGRWV	SL	AVPTTQKQ	-----	EPF	DEILLDALAVV	-----	YAGDQV
aa5020_protein	LEITGGRWV	SL	AVPTTQKQ	-----	EPF	DEILLDALAVV	-----	YAGDQV
Q99420q99420_put_hm_H7-3	LEITGGRWV	SL	AVPTTQKQ	-----	EPF	DEILLDALAVV	-----	YAGDQV

H7-1_HUMAN	CCITFCFAFC	-----	REKRNQ	-----	RLKESVAPV	-----	-----
Q28499_rhesus_H7-1	CCITFCFAFC	-----	REKRNQ	-----	RLKESVAPV	-----	-----
H7-1_RABBIT	YCLACRIVAM	-----	KRDESE	-----	LVGTERLSFI	-----	YLGSAQSSG
U57755_cat_H7_1	RCVTRPAAW	-----	RQREGRA	-----	RQNKSHLT	-----	-----
H7-1_MOUSE	VWLDACFCFA	-----	SCFQEA	-----	ERLINSLEP	-----	GFEEALAEQVFL
AF157827_cat_H7-2	SFKTLRKR	-----	QPCSEEC	-----	ELKPKRERK	-----	QTKERVYEVFERSD
aa117297_dog_H7-2	FFVTLRKR	-----	QPCSEEC	-----	ELKPKRERK	-----	QTKERVYEVFERSD
176088-pig_H7-2	SFKTLRKR	-----	QPCSEEC	-----	ELKPKRERK	-----	QTKERVYEVFERSD
u04343_hm_H7-2	CLVTLRKR	-----	RPRNSYC	-----	QNTNERKSE	-----	QTKERVYEVFERSD
P42082_mus_H7_2	LLVTLRKR	-----	QPCSEEC	-----	ASLLEKDSN	-----	ADRETLNL
aac52336_mus_H7-2_alt.spl	LLVTLRKR	-----	QPCSEEC	-----	ASLLEKDSN	-----	ADRETLNL
aa5020_protein	LLVTLRKR	-----	QPCSEEC	-----	ASLLEKDSN	-----	ADRETLNL
Q99420q99420_put_hm_H7-3	LLVTLRKR	-----	QPCSEEC	-----	ASLLEKDSN	-----	ADRETLNL

H7-1_HUMAN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Q28499_rhesus_H7-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
H7-1_RABBIT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
U57755_cat_H7_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
H7-1_MOUSE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF157827_cat_H7-2	-AQC-VHLKPTASGDQQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----
aa117297_dog_H7-2	-AQC-VHLKPTASGDNSTQF	-----	-----	-----	-----	-----	-----
176088-pig_H7-2	-AQC-VHLKPTASGDNSTQF	-----	-----	-----	-----	-----	-----
u04343_hm_H7-2	-AQRVFKSSKRSCKSDTCT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P42082_mus_H7_2	-LEPQTASAKPMAE	-----	-----	-----	-----	-----	-----
aac52336_mus_H7-2_alt.spl	-LEPQTASAKPMAE	-----	-----	-----	-----	-----	-----
aa5020_protein	SFTCFVSLRDNGSAAVSLQVAIFYSKFSMTLEPRKDLREGDVTLLKCSSTYRQYEAQVW	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Q99420q99420_put_hm_H7-3	SAKINQCALFKPGEKQLQRLLEFVH	-----	-----	-----	-----	-----	-----

H7-1_HUMAN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Q28499_rhesus_H7-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
H7-1_RABBIT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
U57755_cat_H7_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
H7-1_MOUSE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF157827_cat_H7-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
aa117297_dog_H7-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
176088-pig_H7-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
u04343_hm_H7-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P42082_mus_H7_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
aac52336_mus_H7-2_alt.spl	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
aa5020_protein	QDGQGVPLTGNVTTTSMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGPTSCLVNRFVFLQDDAHGVSVIT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Q99420q99420_put_hm_H7-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

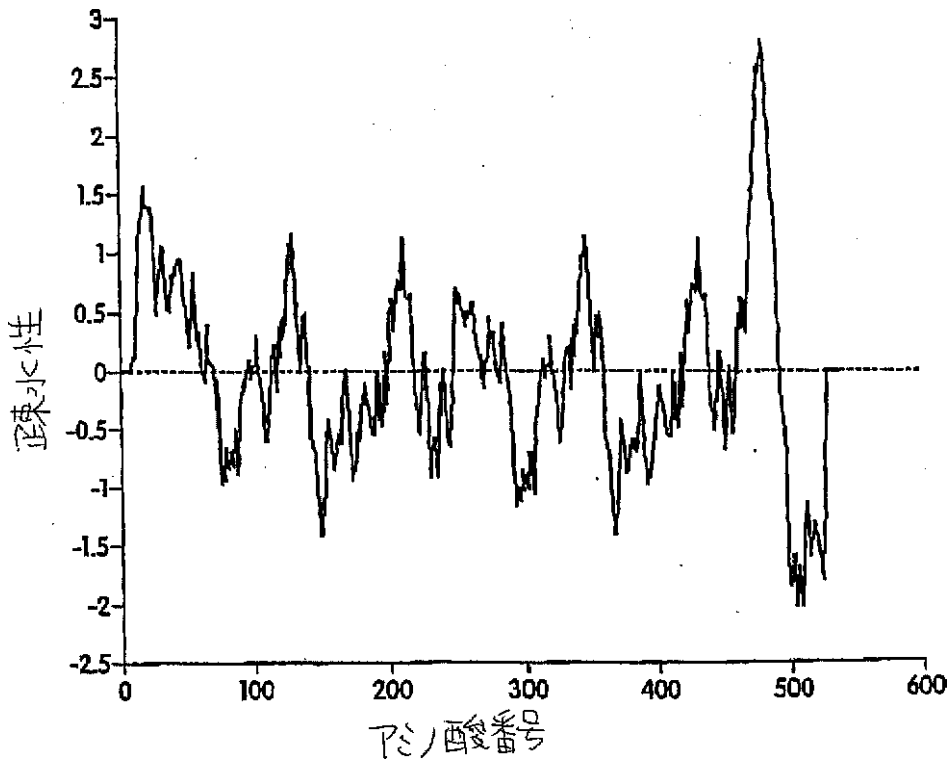
図4-1

【図4-2】

B7-1_HUMAN	-----
Q28499_rhesus_B7-1	-----
B7-1_RABBIT	-----
U57755_cat_B7_1	-----
B7-1_MOUSE	-----
AF157827_cat_B7-2	-----
aa117297_dog_B7-2	-----
176088-pig_B7-2	-----
w04343_hu_B7-2	-----
P42082_mus_B7_1	-----
aa52336_mus_B7-2_alt.spl	-----
zz5020.protein	QPPEITFPPEALNVTVGLSVCLTALNVALAFVCRRIKIQSCPEENAGAEQDGEQEGSKTA
Q99420:Q99420_put_hum_B7-3	-----
B7-1_HUMAN	-----
Q28499_rhesus_B7-1	-----
B7-1_RABBIT	-----
U57755_cat_B7_1	-----
B7-1_MOUSE	-----
AF157827_cat_B7-2	-----
aa117297_dog_B7-2	-----
176088-pig_B7-2	-----
w04343_hu_B7-2	-----
P42082_mus_B7_1	-----
aa52336_mus_B7-2_alt.spl	-----
zz5020.protein	LQPLKHSDSKEDGQETA
Q99420:Q99420_put_hum_B7-3	-----

図4つづき

【図5】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No PCT/US 00/24220
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/12 C12N15/85 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N A61K		
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, STRAND		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 00 68266 A (BECKER GERALD WAYNE ;JOHNSTONE EDWARD MARION (US); LITTLE SHEILA P) 16 November 2000 (2000-11-16) page 7 -page 9 page 14 -page 17 SEQ ID NO 2 and 4	1-25,27
P,X	WO 99 46281 A (BAKER KEVIN P ;CHEN JIAN (US); GENENTECH INC (US); GURNEY AUSTIN ()) 16 September 1999 (1999-09-16) page 12, line 10 - line 22 claim 12; figure 51 figure 50	1-25,27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 January 2001		Date of mailing of the international search report 17/01/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Blanco Urgoiti, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/24220

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0068266 A	16-11-2000	NONE	
WO 9946281 A	16-09-1999	AU 3072199 A	27-09-1999
		AU 3075099 A	11-10-1999
		EP 1064382 A	03-01-2001
		WO 9947677 A	23-09-1999
		AU 1532499 A	15-06-1999
		EP 1032667 A	06-09-2000
		WO 9927098 A	03-06-1999
		AU 3757099 A	08-11-1999
		WO 9954467 A	28-10-1999
		AU 1070399 A	10-05-1999
		EP 1025227 A	09-08-2000
		WO 9920756 A	29-04-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト'(参考)
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
45/00		A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
48/00		11/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10		19/02	
11/06		19/04	
19/02		21/00	
19/04		21/04	
21/00		25/00	
21/04		29/00	
25/00			1 0 1
29/00		31/04	
	1 0 1	31/10	
31/04		31/12	
31/10		35/00	
31/12		37/02	
35/00		C 0 7 K 14/47	
37/02		16/18	
C 0 7 K 14/47		C 1 2 P 21/02	C
16/18		C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02		1/68	A
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z
1/68		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		33/53	D
33/50			M
33/53		33/566	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 6 0 / 1 8 3 , 5 7 8  
(32)優先日 平成12年2月18日(2000.2.18)  
(33)優先権主張国 米国( U S )  
(31)優先権主張番号 0 9 / 6 5 1 , 2 0 0  
(32)優先日 平成12年8月30日(2000.8.30)  
(33)優先権主張国 米国( U S )

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, 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 グリーン, シンシア  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06443,  
 マディソン, ツインブリッジ  
 ロード 29

(72)発明者 コテリアンスキ, ビクター  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 02215, ポストン, アパートメント  
 405, チャールズゲート イースト 4

(72)発明者 デフォウジロールズ, アントニン  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 02446, ブルックライン, ランカスター  
 テラス 11

(72)発明者 キャルリ, ジョン  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 01772, サウスボロウ, ハリス  
 ドライブ 9

(72)発明者 ヘション, キャサリン  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
 02043, ヒングハム, オティス  
 ヒルロード 35

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA36 FB02  
FB03  
4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 CA09  
HA01 HA14 HA17  
4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ43  
QQ79 QR55 QR62 QS25 QS33  
QS34  
4B064 AG31 CA19 CC24 DA01 DA14  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17  
BA01 BA08 BA22 BA23 MA01  
NA14 ZA012 ZA592 ZA942  
ZA962 ZB052 ZB072 ZB112  
ZB152 ZB262 ZB332 ZB352  
4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 EE01  
GG01  
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16  
MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA59  
ZA94 ZA96 ZB05 ZB07 ZB11  
ZB15 ZB26 ZB33 ZB35  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40  
DA75 DA86 EA28 EA51

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003516719A5</a>	公开(公告)日	2007-10-18
申请号	JP2001521740	申请日	2000-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP 拜奥根有限公司		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司 生物遗传公司		
当前申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司 生物遗传公司		
[标]发明人	グリーンシンシア コテリアンスキビクター デフォウジロールズアントニン キャルリジョン ヘシヨンキャサリン		
发明人	グリーン, シンシア コテリアンスキ, ビクター デフォウジロールズ, アントニン キャルリ, ジョン ヘシヨン, キャサリン		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31 /12 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K16/18 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 A61K38/00		
CPC分类号	A61K38/00 Y10S435/81 C07K14/70532 A61P11/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P29 /00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K16/18 C12P21/02. C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063 /QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084 /BA22 4C084/BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA592 4C084/ZA942 4C084 /ZA962 4C084/ZB052 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084 /ZB352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086 /ZA01 4C086/ZA59 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB05 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51		
优先权	60/152383 1999-09-03 US 60/172909 1999-12-21 US 60/183578 2000-02-18 US		

其他公开文献

JP2003516719A

---

摘要(译)

本发明提供了新颖的分离的BLAA多核苷酸和由BLAA多核苷酸编码的膜结合的或分泌的多肽。还提供了与BLAA多肽或BLAA多肽，多核苷酸或抗体的任何衍生物，变体，突变体或片段免疫特异性结合的抗体。本发明进一步提供了将BLAA多肽，多核苷酸和抗体用于多种病理状况的检测和治疗的方法，以及用于其他用途的方法。