

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-507228

(P2006-507228A)

(43) 公表日 平成18年3月2日(2006.3.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 6 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 249 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2004-518233 (P2004-518233)	(71) 出願人	501401582
(86) (22) 出願日	平成15年7月1日(2003.7.1)		ザ ケネス エス. ウォーレン インステ イテュート, インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月25日(2005.2.25)		アメリカ合衆国 10562 ニューヨー ク州, オッシニング キッチャワン ロー ド 712
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/020964	(71) 出願人	505004835
(87) 国際公開番号	W02004/003176		ハー. ルンドベック アー/エス
(87) 国際公開日	平成16年1月8日(2004.1.8)		デンマーク国 デーカー-2500 ファ ルビー-コペンハーゲン, オッティリアフ シェ 9
(31) 優先権主張番号	60/392, 455	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成14年7月1日(2002.7.1)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	60/393, 423		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成14年7月3日(2002.7.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 応答性の細胞、組織および器官を保護、回復ならびに増強するための組換え型組織保護サイトカインおよびそれをコードする核酸

(57) 【要約】

組換え型組織保護サイトカインなどのエリスロポエチン受容体活性調節物質の全身もしくは局所投与によって、ヒトを含む哺乳動物における応答性細胞、組織、器官もしくは身体部分の機能または生存能を in vivo、in situ または ex vivo で保護または増強するための方法および組成物が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヘマトクリットの上昇、血管活性作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失しているムテイン組換え型組織保護サイトカインであって、哺乳動物の応答性細胞、組織または器官の機能または生存能の保護、維持、増強または回復からなる群より選択される少なくとも1つの応答性細胞保護活性を有する、上記組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項2】

配列番号10の11位から15位〔配列番号1〕の間、配列番号10の44位から51位〔配列番号2〕の間、配列番号10の100位から108位〔配列番号3〕の間、または配列番号10の146位から151位〔配列番号4〕の間に1個以上の改変されたアミノ酸残基を含む、請求項1に記載の組換え型組織保護サイトカイン。 10

【請求項3】

配列番号10の次の位置：7、20、21、29、33、38、42、59、63、67、70、83、96、126、142、143、152、153、155、156、または161の1以上の位置に改変されたアミノ酸残基を含む、請求項1に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項4】

配列番号15～105および119の1以上のアミノ酸残基置換を有する配列番号10のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項5】

配列番号10のアミノ酸残基44～49の欠失を有する配列番号10のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の組換え型組織保護サイトカイン。 20

【請求項6】

配列番号106～118の以下のアミノ酸残基置換を少なくとも1つ有する配列番号10のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項7】

1個以上のアミノ酸の化学的修飾をさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項8】

化学的修飾が組換え型組織保護サイトカインの電荷を変えることを含む、請求項7に記載の組換え型組織保護サイトカイン。 30

【請求項9】

荷電アミノ酸残基が非荷電アミノ酸残基に改変される場合は、正電荷または負電荷がアミノ酸残基に化学的に付加される、請求項8に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項10】

前記サイトカインがヒト・エリスロポエチン突然変異タンパク質である、請求項1～6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項11】

前記サイトカインがヒト・フェニルグリオキサールエリスロポエチン突然変異タンパク質である、請求項1～6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカイン。 40

【請求項12】

哺乳動物の応答性細胞が神経、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管、内皮、精巣、卵巣もしくは子宮内膜の細胞、または幹細胞を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項13】

光受容器、神経節、双極細胞、水平細胞、無軸索細胞、ミュラー細胞、心筋層、ペースメーカー、洞房結節、洞結節、房室結節、ヒス束、肝細胞、星細胞、クップファー細胞、血管間膜細胞、杯細胞、腸腺、腸内分泌線、球状帯細胞、線維束、網状帯細胞、クロム親和細胞、周皮細胞、ライディヒ細胞、セルトーリ細胞、精子、グラーフ卵胞、原始卵胞、子宮内膜間質、および子宮内膜細胞を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の組換え型 50

組織保護サイトカイン応答性哺乳動物細胞。

【請求項14】

前記サイトカインが内皮細胞関門を通過することができる、請求項1～6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項15】

内皮細胞関門が血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門、および血液子宮関門を含む、請求項14に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項16】

前記サイトカインが以下のサイトカインからなる群より選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

- i. シアル酸成分の数が減少しているかまたはシアル酸成分が存在しないサイトカイン、
- ii. N結合型糖鎖またはO結合型糖鎖の数が減少しているかまたは前記糖鎖が存在しないサイトカイン、
- iii. 天然サイトカインを少なくとも1種のグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量が低下しているサイトカイン、
- iv. 少なくとも1個以上の酸化された糖鎖を有するサイトカイン、
- v. 化学的に還元されている少なくとも1個以上の酸化された糖鎖を有するサイトカイン、
- vi. 少なくとも1個以上の修飾されたアルギニン残基を有するサイトカイン、
- vii. 少なくとも1個以上の修飾されたリシン残基を有するかまたはサイトカイン分子のN末端アミノ基の修飾を有するサイトカイン、
- viii. 少なくとも修飾されたチロシン残基を有するサイトカイン、
- ix. 少なくとも修飾されたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を有するサイトカイン、
- x. 少なくとも修飾されたトリプトファン残基を有するサイトカイン、
- xi. 少なくとも1個のアミノ酸基が除去されているサイトカイン、
- xii. サイトカイン分子中の少なくとも1つのシスチン結合の少なくとも1つの開裂を有するサイトカイン、
- xiii. トランケート型サイトカイン、
- xiv. 少なくとも1つのポリエチレングリコール分子が結合されているサイトカイン、
- xv. 少なくとも1つの脂肪酸が結合されているサイトカイン、
- xvi. 非哺乳動物細胞において組換え型サイトカインを発現させることによって非哺乳動物グリコシル化パターンを有するサイトカイン、
- xvii. 精製を容易にするためにヒスチジンでタグ付けされたアミノ酸を少なくとも1個有するサイトカイン

【請求項17】

前記サイトカインがアシアロエリスロポエチンである、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項18】

前記アシアロエリスロポエチンがヒト・アシアロエリスロポエチンである、請求項17に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項19】

前記サイトカインが低シアル化または高シアル化されている、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項20】

前記サイトカインが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13個のシアル酸成分を含む、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項21】

前記サイトカインが天然のエリスロポエチンに存在する14個のシアル酸成分より多いシ

10

20

30

40

50

アル酸成分を含む、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項22】

前記サイトカインがN結合型糖鎖をもたないエリスロポエチンである、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項23】

前記サイトカインがO結合型糖鎖をもたないエリスロポエチンである、請求項22に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項24】

前記サイトカインが少なくとも1種のグリコシダーゼで処理されている、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項25】

前記サイトカインが過ヨウ素酸塩で酸化されたエリスロポエチンである、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項26】

過ヨウ素酸塩で酸化されたエリスロポエチンがシアノ水素化ホウ素ナトリウムで化学的に還元される、請求項25に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項27】

前記サイトカインが1個以上のアルギニン残基にR-グリオキサル部分を含み、ここにおいて、Rはアリールまたはアルキル部分である、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項28】

前記サイトカインがフェニルグリオキサル-エリスロポエチンである、請求項27に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項29】

前記サイトカインが、2,3-ブタンジオンおよびシクロヘキサジオンからなる群より選択されるピシナルジケトンとの反応によりアルギニン残基を修飾したエリスロポエチンである、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項30】

前記サイトカインが、アルギニン残基を3-デオキシグルコソンと反応させたエリスロポエチンである、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項31】

前記サイトカインが少なくとも1個のピオチン化リシンまたはN末端アミノ基を有する分子である、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項32】

前記サイトカインがグルシトリルリシンエリスロポエチンまたはフルクトシルリシンエリスロポエチンである、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項33】

前記サイトカインが少なくとも1個のカルバミル化リシン残基を含む、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項34】

前記カルバミル化サイトカインが N-カルバモイルエリスロポエチン、N-カルバモイルエリスロポエチン、N-カルバモイル、N-カルバモイルエリスロポエチン、N-カルバモイルアシアロエリスロポエチン、N-カルバモイルアシアロエリスロポエチン、N-カルバモイル、N-カルバモイルアシアロエリスロポエチン、N-カルバモイルハイポシアロエリスロポエチン、N-カルバモイルハイポシアロエリスロポエチン、およびN-カルバモイル、N-カルバモイルハイポシアロエリスロポエチンからなる、請求項33に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項35】

前記サイトカインが少なくとも1個のアシル化リシン残基を含む、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

10

20

30

40

50

【請求項36】

前記サイトカインが少なくとも1個のアシル化リシン残基を含む、請求項35に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項37】

前記サイトカインが少なくとも1個のアセチル化リシン残基を含む、請求項36に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項38】

前記アセチル化サイトカインが -N-アセチルエリスロポエチン、N- -アセチルエリスロポエチン、 -N-アセチル,N- -アセチルエリスロポエチン、 -N-アセチルアシアロエリスロポエチン、N- -アセチルアシアロエリスロポエチン、 -N-アセチル,N- -アセチルアシアロエリスロポエチン、 -N-アセチルハイポシアロエリスロポエチン、N- -アセチルハイポシアロエリスロポエチン、および -N-アセチル,N- -アセチルハイポシアロエリスロポエチンからなる、請求項37に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

10

【請求項39】

前記サイトカインのリシン残基がスクシニル化されている、請求項35に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項40】

前記スクシニル化サイトカインが -N-スクシニルエリスロポエチン、N- -スクシニルエリスロポエチン、 -N-スクシニル,N- -スクシニルエリスロポエチン、 -N-スクシニルアシアロエリスロポエチン、N- -スクシニルアシアロエリスロポエチン、 -N-アセチル,N- -アセチルアシアロエリスロポエチン、 -N-スクシニルハイポシアロエリスロポエチン、N- -スクシニルハイポシアロエリスロポエチン、および -N-スクシニル,N- -スクシニルハイポシアロエリスロポエチンからなる、請求項39に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

20

【請求項41】

前記サイトカインが2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムまたは他のその塩により修飾されたリシン残基を少なくとも1個含む、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項42】

前記サイトカインがニトロ化またはヨウ素化されたチロシン残基を少なくとも1個含む、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

30

【請求項43】

前記サイトカインがカルボジイミドと反応させた後にアミンと反応させたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含む、請求項16に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項44】

前記アミンがグリシンアミドである、請求項43に記載の組換え型組織保護サイトカイン。

【請求項45】

請求項1~6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカインからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離された核酸分子。

40

【請求項46】

請求項45に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項47】

請求項45に記載の核酸分子および該核酸分子に機能的に連結された少なくとも1つの調節領域を含む発現ベクター。

【請求項48】

pCiNeoベクターである、請求項46または47に記載のベクター。

【請求項49】

請求項45に記載の核酸分子を含む遺伝子操作された細胞。

【請求項50】

50

請求項47に記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項51】

ヘマトクリットの上昇、血管活性作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失しており、かつ哺乳動物の応答性細胞、組織または器官の機能または生存能の保護、維持、増強または回復からなる群より選択される少なくとも1つの応答性細胞保護活性を有する、請求項1~6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカインを含有する医薬組成物。

【請求項52】

経口、鼻腔内または非経口投与用に製剤化された、請求項51に記載の医薬組成物。

【請求項53】

灌流溶液として製剤化された、請求項51に記載の医薬組成物。

【請求項54】

哺乳動物の身体から単離した細胞、組織または器官の生存能を保護、維持、または増強する方法であって、前記細胞、組織または器官を、突然変異タンパク質組換え型組織保護サイトカインを含有する医薬組成物に曝露することを含む上記方法。

【請求項55】

前記保護が骨髄に作用しない、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

哺乳動物の身体から単離した細胞、組織または器官の生存能を保護、維持、または増強する方法であって、前記細胞、組織または器官を、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失している請求項1~6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカインを含有する医薬組成物に曝露することを含む上記方法。

【請求項57】

組織損傷からの保護用の、組織損傷の防止用の、ならびに哺乳動物における組織および組織機能の回復および若返り用の医薬組成物を製造するための、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失している請求項1~6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカインの使用。

【請求項58】

前記損傷が痙攣障害、多発性硬化症、発作、低血圧、心停止、虚血、心筋梗塞、炎症、加齢による認知機能の喪失、放射線障害、脳性麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、AIDS痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール中毒症、気分障害、不安障害、注意欠陥障害、自閉症、クロイツフェルト-ヤコブ病、脳脊髄の損傷もしくは虚血、心肺バイパス、慢性心不全、黄斑変性、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、または網膜損傷により引き起こされる、請求項57に記載の使用。

【請求項59】

哺乳動物において内皮細胞関門を越える分子のトランスサイトーシスを促進するための方法であって、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失している請求項1~6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカインと会合している前記分子を含有する組成物を、前記哺乳動物に投与することを含む上記方法。

【請求項60】

前記会合が、前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定した共有結合、または非共有結合である、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

内皮細胞関門が、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門、血液心臓関門、血液腎臓関門、および血液胎盤関門からなる群より選択される、請求項59に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項62】

前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌剤、抗ウイルス剤、放射性医薬品、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、免疫抑制剤、染料、マーカー、または抗癌剤である、請求項59に記載の方法。

【請求項63】

内皮細胞関門を越えるトランスサイトーシスにより分子を輸送するための組成物であって、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失している請求項1~6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカインと会合している前記分子を含有する、上記組成物。

10

【請求項64】

前記会合が、前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定した共有結合、または非共有結合である、請求項63に記載の組成物。

【請求項65】

前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌剤、放射性医薬品、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、免疫抑制剤、染料、マーカー、または抗癌剤である、請求項63に記載の組成物。

【請求項66】

ヘマトクリットの上昇、血管活性作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失している請求項1~6のいずれか1項に記載の組換え型組織保護サイトカインの使用。

20

【請求項67】

前記会合が、前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定した共有結合、または非共有結合である、請求項66に記載の使用。

【請求項68】

前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌剤、放射性医薬品、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、免疫抑制剤、染料、マーカー、または抗癌剤である、請求項66に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

1. 序

本発明は、1以上のアミノ酸置換を有するムテイン組換え型組織保護サイトカイン、哺乳動物の応答性細胞ならびにそれらに関連する細胞、組織および器官の機能または生存能を保護、維持、増強、または回復するための前記サイトカインを含有する医薬組成物に関する。これには、神経組織や心臓組織のような興奮性の組織の、神経毒、低酸素およびその他の有害な刺激からの保護、ならびに学習や記憶の促進のためなどの興奮性組織の機能の増強が含まれる。本発明はさらに、ムテイン組換え型組織保護サイトカインを用いて内皮細胞関門を越えるトランスサイトーシスにより分子を輸送するための、またはその輸送を促進するための組成物に関する。

40

【0002】

2. 発明の背景

長年の間、唯一明らかなエリスロポエチンの生理学的役割は、赤血球産生の制御のみであった。最近になって、サイトカインスーパーファミリーのメンバーであるエリスロポエチンは、エリスロポエチン受容体(エリスロポエチンR)との相互作用により媒介される他の重要な生理学的機能を果たすことを示す幾つかの証拠が得られた。これらの作用としては、有糸分裂誘発、平滑筋細胞および神経細胞内へのカルシウム流入の調節、血管活性作用(すなわち、血管収縮/血管拡張)、血小板の高活性化、ならびに中間代謝への影響が挙げられる。エリスロポエチンは、低酸素性の細胞内ミクロ環境を改善するばかりでなく、代謝ストレスにより引き起こされるプログラムされた細胞死を調節するように働く代

50

償性応答をもたらすと考えられている。研究により、頭蓋内に投与されたエリスロポエチンは低酸素性神経損傷からニューロンを保護することが立証されたが、頭蓋内投与は、(特に正常な個体への)治療用途のための投与経路としては実用的ではなく、受け入れがたいものである。さらに、エリスロポエチンを投与した貧血患者の以前の研究からは、末梢投与されたエリスロポエチンは脳内に輸送されないという結論が出された(Martiら, 1997, *Kidney Int.* 51:416-8; Juulら, 1999, *Pediatr. Res.* 46:543-547; Buemiら, 2000, *Nephrol. Dial. Transplant.* 15:422-433)。

【0003】

エリスロポエチンの様々な修飾形態がこれまでに記載されており、その活性は赤血球産生作用を改良する方向に向けられてきた。例えば、米国特許第5,457,089号および米国特許第4,835,260号に記載される、カルボキシ末端に改変されたアミノ酸を有するもの；米国特許第5,856,298号に記載されるような、1分子あたり様々な数のシアル酸残基を有するエリスロポエチンのアイソフォーム；米国特許第4,703,008号に記載されるポリペプチド；米国特許第5,767,078号に記載されるアゴニスト；米国特許第5,773,569号および第5,830,851号に記載されるエリスロポエチン受容体に結合するペプチド；ならびに米国特許第5,835,382号に記載される小分子ミメチックなどがある。

10

【0004】

本発明は、応答性細胞および関連する細胞、組織、器官を *in situ* だけでなく *ex vivo* でも保護、維持、増強または回復するための組換え型組織保護サイトカインの使用、ならびに血管系に対し遠位にある応答性細胞および関連する細胞、組織、器官を保護し増強することを目的とした内皮細胞関門を越える組換え型組織保護サイトカインの送達、すなわち会合した分子の運搬に関する。

20

【発明の開示】

【0005】

3. 発明の概要

1つの態様において、本発明は、哺乳動物の応答性細胞ならびにそれらに関連する細胞、組織および器官の機能または生存能を保護、維持、増強または回復する医薬組成物を調製するための、様々な形態の組換え型組織保護サイトカインの使用に関する。1つの具体的な態様において、哺乳動物の応答性細胞、それらに関連する細胞、組織および器官は、密な内皮細胞関門の存在によって血管系に対し遠位にある。他の具体的な態様において、これらの細胞、組織、器官または他の身体部分は、哺乳動物の身体から単離されたもの(例えば移植用のもの)である。非限定的な例として、応答性細胞または組織は、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣、脾臓、骨、皮膚または子宮内膜の細胞もしくは組織でありうる。応答性細胞の別の非限定的な例として、光受容器(桿体および錐体)、神経節、双極細胞、水平細胞、無軸索細胞、ミュラー細胞、プルキンエ細胞、心筋層、ペースメーカー、洞房結節、洞結節、房室結節、ヒス束、肝細胞、星細胞、クップファー細胞、血管間膜細胞、腎上皮細胞、管状間質細胞、杯細胞、腸腺、腸内分泌線、球状帯細胞、線維束、網状帯細胞、クロム親和細胞、周皮細胞、ライディヒ細胞、セルトーリ細胞、精子、グラーフ卵胞、原始卵胞、ランゲルハンス島細胞、細胞、細胞、細胞、F細胞、前骨芽細胞、破骨細胞、骨芽細胞、子宮内膜間質、子宮内膜細胞、幹および内皮細胞が挙げられる。応答性細胞のこれらの例は単に例示的なものである。1つの態様において、応答性細胞、それらに関連する細胞、組織または器官は、興奮性の細胞、組織もしくは器官ではないし、また、主として興奮性細胞もしくは組織を含むものでもない。特定の実施形態において、上記組換え型組織保護サイトカインを用いる対象の哺乳動物細胞、組織または器官は、その細胞、組織または器官の生存能に対して有害な少なくとも1つの条件下で一定時間を費やしたものの、またはこれから費やすものである。特定の実施形態において、上記組換え型組織保護サイトカインを用いる対象の哺乳動物細胞、組織または器官は、EPO受容体を発現するものである。このような条件としては、外傷性の *in situ* 低酸素もしくは代謝性機能不全、外科手術により誘導される *in situ* 低酸素もしくは代謝性機能不全、または *in situ* 毒素曝露が挙げられる。 *in*

30

40

50

situ毒素曝露は、化学療法または放射線療法と関連しうる。1つの実施形態において、有害条件は、ある種の外科手術で使用されるような心肺バイパス（人工心肺装置）の結果としてもたらされる。

【0006】

本発明の組換え型組織保護サイトカインは、主に神経的もしくは精神的な症状を有する中枢神経系(CNS)または末梢神経系のヒト疾患、ならびに眼の疾患、心血管疾患、心肺疾患、呼吸器疾患、腎疾患、尿路疾患、生殖器疾患、胃腸疾患、内分泌性および代謝性異常の治療や予防に有用である。

【0007】

また、本発明は、哺乳動物、特にヒトに投与するための特定の上記組換え型組織保護サイトカインを含有する医薬組成物にも関する。このような医薬組成物は、経口、鼻腔内、または非経口投与用に製剤化したり、あるいは細胞、組織もしくは器官の生存能をex vivoで維持するための灌流溶液として製剤化することができる。

10

【0008】

上記目的のために有用な組換え型組織保護サイトカインは、ムテイン型または遺伝子改変型エリスロポエチン、すなわち、天然分子のアミノ酸骨格に少なくとも1つの改変・修飾が存在するエリスロポエチンでありうる。「突然変異タンパク質」、「変異タンパク質」または「ムテイン」とは、突然変異アミノ酸配列を含むタンパク質を意味し、アミノ酸の欠失、置換、またはその両方のために天然エリスロポエチンのアミノ酸配列と相違するポリペプチドを包含する。「天然配列」とは、遺伝子またはタンパク質の野生型もしくは天然の形態と同一のアミノ酸配列または核酸配列を意味する。さらに、ある実施形態において、本発明の組換え型組織保護サイトカインは細胞保護活性を有するが、さらにエリスロポエチンの骨髄に対する作用、すなわち、ヘマトクリット（赤血球産生）の上昇、血管活性作用（血管収縮/血管拡張）、血小板の高活性化、栓球産生の増加、および血液凝固活性のうちの1以上の作用も有する。別の実施形態においては、本発明の組換え型組織保護サイトカインは細胞保護活性を有するが、エリスロポエチンの骨髄に対する作用、すなわち、ヘマトクリット（赤血球産生）の上昇、血管活性作用（血管収縮/血管拡張）、血小板の高活性化、栓球産生の増加、および血液凝固活性のうちの1以上の作用を有しない。好ましくは、本発明の細胞保護性の組換え型組織保護サイトカインはエリスロポエチンの骨髄に対する作用の少なくとも1つを欠いている。さらに好ましくは、組換え型組織保護サイトカインは赤血球産生作用（erythropoietic activity）を欠くだろう。最も好ましくは、組換え型組織保護サイトカインはエリスロポエチンの骨髄に対する作用をすべて欠失している。

20

30

【0009】

非限定的な例としては、天然のエリスロポエチン分子に対して1個以上のアミノ酸を変化させることができ、欠失または付加が可能である。好ましい実施形態では、組換え型組織保護サイトカインは以下の領域の1以上の領域に1以上の改変・修飾を有する：VLQRY（天然ヒト・エリスロポエチンのアミノ酸11-15；配列番号1）および/またはTKVNFYAW（天然ヒト・エリスロポエチンのアミノ酸44-51；配列番号2）および/またはSGLRSLTTL（天然ヒト・エリスロポエチンのアミノ酸100-108；配列番号3）および/またはSNFLRG（天然ヒト・エリスロポエチンのアミノ酸146-151；配列番号4）。その他の突然変異は配列番号10のアミノ酸7、20、21、29、33、38、42、59、63、67、70、83、96、126、142、143、152、153、155、156、および161に存在しうる。これらの他の突然変異は単独で存在してもよいし、上記領域の少なくとも1つの領域の少なくとも1つの突然変異に加えて存在してもよい。特定の実施形態では、TKVNFYAW（天然ヒト・エリスロポエチンのアミノ酸44-51；配列番号2）の1個以上のアミノ酸の変更は、不完全な機能を有する、すなわち、rhu-EP0より劣った赤血球産生作用を有する改変型エリスロポエチン分子をもたらす。他の実施形態では、SGLRSLTTL（天然ヒト・エリスロポエチンのアミノ酸100-108；配列番号3）の1個以上のアミノ酸の変更は、不完全な機能を有する、すなわち、rhu-EP0より劣った赤血球産生作用を有する組換え型組織保護サイトカインをもたらす。上記の組換え型組織保護

40

50

サイトカインは組織保護または細胞保護活性を示す。赤血球産生作用に関して、上記の組換え型組織保護サイトカインは欠失しているか、または1以上の赤血球産生作用の低下を示す。赤血球産生作用の例として、ヘマトクリットの上昇、血管収縮、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加が挙げられる。赤血球産生作用は当技術分野で標準的な技法を用いて測定することができる。例えば、ヘマトクリットは第6.17節に記載するUT-7細胞アッセイを用いて、または参照によりその全体を本明細書に組み入れるPhysicians' Desk Reference (Medical Economics Company, Inc., Montvale, NJ, 2000)に記載される技法を用いて測定しうる。特に、第519-525頁と第2125-2131頁には、ヘマトクリットレベルの測定に使用できる方法が開示されており、また、毒性を回避するための標的として使用しうる様々なヘマトクリット範囲が記載されている。例えば、慢性腎不全の患者では、上記PDRは、患者において30%から36%の範囲の無毒性目標ヘマトクリットを達成するようなエリスロポエチンの服用を推奨している(例えば、PDR, p. 523, col. 1, ll. 17-96 および p. 2129, col. 1, ll. 8-93、ならびに cols. 2 および 3中の表を参照されたい)。PDRは、赤血球増加症(循環している赤血球細胞の数の異常な増加を特徴とする症状)の形の毒性は、ヘマトクリットを注意深く監視してEPOの用量を調節し、ヘマトクリットが標的範囲の上限(この患者集団では36%)に達するかまたは2週間で4ポイントより多く増加したら、ヘマトクリットが提案された目標範囲(この患者集団では30%から36%; PDR, p. 523, col. 1, および p. 2129, col. 1 "Dose Adjustment" 参照)に戻るまで、エリスロポエチンの投与を差し控えることにより、回避できると記している。対照的に、化学療法を受けている癌患者の場合には、PDRは、異なるヘマトクリットレベル(すなわち、ヘマトクリットが40%を超える場合)で投与量を調節することを教示している(p. 2129, col. 2 "Dose Adjustment" 参照)。ある実施形態では、組換え型組織保護サイトカインは1以上の赤血球産生作用を有するが、そのレベルは、有害作用(すなわち、組換え型組織保護サイトカインの細胞保護活性の治療効果を抑える作用)を引き起こすには十分でないものである。ある実施形態では、1以上の赤血球産生作用を有する組換え型組織保護サイトカインは、赤血球産生作用を測定するという条件で、本発明の方法においてなおも使用することができる。組換え型組織保護サイトカインが1以上の赤血球産生作用を有する実施形態では、その1以上の赤血球産生作用を測定して、組換え型組織保護サイトカインの毒性を確実に無くするように該サイトカインの投与量および/または投与計画を調整することができる。組換え型組織保護サイトカインが1以上の赤血球産生作用を有する実施形態では、その赤血球産生作用を測定して、組換え型組織保護サイトカインの毒性を確実に低くするように該サイトカインの投与量および/または投与計画を調整することができる。ある実施形態では、組換え型組織保護サイトカインは、1以上の赤血球産生作用が、組換え型Epoと比較して、約1%、2%、4%、6%、8%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%低下している。

【0010】

本発明は、ヘマトクリットの上昇、血管収縮作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失している組換え型組織保護サイトカインを提供する。前記サイトカインは応答性哺乳動物細胞、組織または器官の機能または生存能の保護、維持、増強または回復からなる群より選択される少なくとも1つの応答性細胞保護活性を有する。

【0011】

本発明の一実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、配列番号10の11位から15位[配列番号1]の間、配列番号10の44位から51位[配列番号2]の間、配列番号10の100位から108位[配列番号3]の間、または配列番号10の146位から151位[配列番号4]の間に1個以上の改変されたアミノ酸残基を含む。

【0012】

別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、配列番号10の次の位置：7 50

、20、21、29、33、38、42、59、63、67、70、83、96、126、142、143、152、153、155、156、または161の1以上の位置に改変されたアミノ酸残基を含む。

【0013】

さらに別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、1以上の以下の改変を有する配列番号10のアミノ酸配列を含む（それぞれの改変型配列は別の配列識別番号を指定されている）：配列番号10の残基6にアラニン（配列番号15）；配列番号10の残基7にアラニン（配列番号16）；配列番号10の残基7にセリン（配列番号17）；配列番号10の残基10にイソロイシン（配列番号18）；配列番号10の残基11にセリン（配列番号19）；配列番号10の残基12にアラニン（配列番号20）；配列番号10の残基13にアラニン（配列番号21）；配列番号10の残基14にアラニン（配列番号22）；配列番号10の残基14にグルタミン酸（配列番号23）；配列番号10の残基14にグルタミン（配列番号24）；配列番号10の残基15にアラニン（配列番号25）；配列番号10の残基15にフェニルアラニン（配列番号26）；配列番号10の残基15にイソロイシン（配列番号27）；配列番号10の残基20にグルタミン酸（配列番号28）；配列番号10の残基20にアラニン（配列番号29）；配列番号10の残基21にアラニン（配列番号30）；配列番号10の残基24にリシン（配列番号31）；配列番号10の残基29にセリン（配列番号32）；配列番号10の残基29にチロシン（配列番号33）；配列番号10の残基30にアスパラギン（配列番号34）；配列番号10の残基32にトレオニン（配列番号35）；配列番号10の残基33にセリン（配列番号36）；配列番号10の残基33にチロシン（配列番号37）；配列番号10の残基38にリシン（配列番号38）；配列番号10の残基83にリシン（配列番号39）；配列番号10の残基42にアスパラギン（配列番号40）；配列番号10の残基42にアラニン（配列番号41）；配列番号10の残基43にアラニン（配列番号42）；配列番号10の残基44にイソロイシン（配列番号43）；配列番号10の残基45にアスパラギン酸（配列番号44）；配列番号10の残基45にアラニン（配列番号45）；配列番号10の残基46にアラニン（配列番号46）；配列番号10の残基47にアラニン（配列番号47）；配列番号10の残基48にイソロイシン（配列番号48）；配列番号10の残基48にアラニン（配列番号49）；配列番号10の残基49にアラニン（配列番号50）；配列番号10の残基49にセリン（配列番号51）；配列番号10の残基51にフェニルアラニン（配列番号52）；配列番号10の残基51にアスパラギン（配列番号53）；配列番号10の残基52にアラニン（配列番号54）；配列番号10の残基59にアスパラギン（配列番号55）；配列番号10の残基62にトレオニン（配列番号56）；配列番号10の残基67にセリン（配列番号57）；配列番号10の残基70にアラニン（配列番号58）；配列番号10の残基96にアルギニン（配列番号59）；配列番号10の残基97にアラニン（配列番号60）；配列番号10の残基100にアルギニン（配列番号61）；配列番号10の残基100にグルタミン酸（配列番号62）；配列番号10の残基100にアラニン（配列番号63）；配列番号10の残基100にトレオニン（配列番号64）；配列番号10の残基101にアラニン（配列番号65）；配列番号10の残基101にイソロイシン（配列番号66）；配列番号10の残基102にアラニン（配列番号67）；配列番号10の残基103にアラニン（配列番号68）；配列番号10の残基103にグルタミン酸（配列番号69）；配列番号10の残基104にアラニン（配列番号70）；配列番号10の残基104にイソロイシン（配列番号71）；配列番号10の残基105にアラニン（配列番号72）；配列番号10の残基106にアラニン（配列番号73）；配列番号10の残基106にイソロイシン（配列番号74）；配列番号10の残基107にアラニン（配列番号75）；配列番号10の残基107にロイシン（配列番号76）；配列番号10の残基108にリシン（配列番号77）；配列番号10の残基108にアラニン（配列番号78）；配列番号10の残基108にセリン（配列番号79）；配列番号10の残基116にアラニン（配列番号80）；配列番号10の残基126にアラニン（配列番号81）；配列番号10の残基132にアラニン（配列番号82）；配列番号10の残基133にアラニン（配列番号83）；配列番号10の残基134にアラニン（配列番号84）；配列番号10の残基140にアラニン（配列番号85）；配列番号10の残基142にイソロイシン（配列番号86）；配列番号10の残基143にアラニン（配列番号87）；配列番号10の残基146にアラニン（配列番号88）；配列番号10の残基147にリシン（配列番号89）；配列番号10の残基147にアラニン（配列番号90）；配列番号10の残基148にチロシン（配列番号91）；配列番号10の残基148にアラニン（配列番号92）；配列番号10の残基149にアラニン（配列番号93）；配列番号10の残基150にアラニン（配列番号94）；配列番号10の残基150にグルタミン酸（配列番号95）；配列番号10の残基151にアラニン（配列番号96）；配列番号10の

残基152にアラニン(配列番号97); 配列番号10の残基152にトリプトファン(配列番号98); 配列番号10の残基153にアラニン(配列番号99); 配列番号10の残基154にアラニン(配列番号100); 配列番号10の残基155にアラニン(配列番号101); 配列番号10の残基158にアラニン(配列番号102); 配列番号10の残基160にセリン(配列番号103); 配列番号10の残基161にアラニン(配列番号104); または配列番号10の残基162にアラニン(配列番号105)。ある実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、配列番号15~105および119の1以上のアミノ酸残基置換を有する配列番号10のアミノ酸配列を含む。

【0014】

さらに別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、配列番号10のアミノ酸残基44~49の欠失を有する配列番号10のアミノ酸配列を含む。

10

【0015】

さらに別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、少なくとも1つの以下の改変を有する配列番号10のアミノ酸配列を含む(それぞれの改変型配列は別の配列識別番号を指定されている): i) 配列番号10の残基45にアスパラギン酸、および残基100にグルタミン酸(配列番号106); ii) 配列番号10の残基30にアスパラギン、残基32にトレオニン(配列番号107); iii) 配列番号10の残基45にアスパラギン酸、残基150にグルタミン酸(配列番号108); iv) 配列番号10の残基103にグルタミン酸、および残基108にセリン(配列番号109); v) 配列番号10の残基140にアラニンおよび残基52にアラニン(配列番号110); vi) 配列番号10の残基140にアラニン、残基52にアラニン、残基45にアラニン(配列番号111); vii) 配列番号10の残基97にアラニン、および残基152にアラニン(配列番号112); ii) x) 配列番号10の残基97にアラニン、残基152にアラニン、残基45にアラニン(配列番号113); ix) 配列番号10の残基97にアラニン、残基152にアラニン、残基45にアラニン、および残基52にアラニン(配列番号114); x) 配列番号10の残基97にアラニン、残基152にアラニン、残基45にアラニン、残基52にアラニン、および残基140にアラニン(配列番号115); xi) 配列番号10の残基97にアラニン、残基152にアラニン、残基45にアラニン、残基52にアラニン、残基140にアラニン、残基154にアラニン、残基24にリシン、残基38にリシン、残基83にリシン、残基24にリシンおよび残基15にアラニン(配列番号116); xii) 配列番号10の残基24にリシン、残基38にリシン、および残基83にリシン(配列番号117); または xiv)

20

配列番号10の残基24にリシンおよび残基15にアラニン(配列番号118)。ある実施形態では、組換え型組織保護サイトカインは、配列番号106~118の少なくとも1つのアミノ酸残基置換を有する配列番号10のアミノ酸配列を含む。

30

【0016】

本発明の一実施形態は、1個以上のアミノ酸の化学的修飾をさらに含む上記の組換え型組織保護サイトカインに関する。別の実施形態において、化学的修飾は組換え型組織保護サイトカインの電荷を変えることを含む。さらに別の実施形態においては、荷電アミノ酸残基が非荷電アミノ酸残基に改変される場合は、正電荷または負電荷がアミノ酸残基に化学的に付加される。

【0017】

さらに、上記の組換え型組織保護サイトカインは、以下の係属中の特許出願に記載されるような1個以上のアミノ酸の化学的修飾によってさらに改変されていてもよい: PCT出願番号PCT/US01/49479(2001年12月28日出願)、米国特許出願番号09/753,132(2000年12月29日出願)、および米国特許出願代理人ファイル番号KW00-009C02-US(2002年7月3日出願)(これらの出願のそれぞれを参照によりそのまま本明細書に組み入れるものとする)。こうした更なる化学的修飾は、組換え型組織保護サイトカインの組織保護活性を増強するため、または組換え型組織保護サイトカインが骨髄に及ぼしうる影響を抑制するため使用される。別の実施形態では、上記の遺伝子修飾の結果として低減することがある該分子の溶解性を回復させるために追加の化学的修飾を行う。例えば、荷電アミノ酸残基が非荷電残基に変えられた場合は、正電荷または負電荷を該分子に化学的に付加する。

40

【0018】

非限定的な例として、本発明の組換え型組織保護サイトカインには以下のものが含まれ

50

る：ヒト・エリスロポエチン突然変異タンパク質S100E（配列番号5）、ヒト・エリスロポエチン突然変異タンパク質K45D（配列番号6）、および非赤血球産生性であるが細胞保護性の組換え型組織保護サイトカインまたは応答性細胞、組織もしくは器官に効果的であるもの。これらは、Elliottら、1997、Blood 89:493-502; Boisselら、Journal of Biological Chemistry, vol. 268, No. 21, pp. 15983-15993 (1993); Wenら、Journal of Biological Chemistry, vol. 269, No. 36, pp. 22839-22846 (1994); および Syedら、Nature, vol. 395, pp. 511-516 (1998)に記載されており、これらの文献はその全体を参照により本明細書に組み入れるものとする。本発明は、応答性細胞、組織および器官を保護し、回復し、増強するための上記の組換え型組織保護サイトカインのいずれかの使用方法に関する。

10

【0019】

本発明の他の組換え型組織保護サイトカインには、少なくとも1つの遺伝的に改変されたアミノ酸を含む上記エリスロポエチンであって、エリスロポエチン分子の少なくとも1個の追加のアミノ酸の別の修飾またはエリスロポエチン分子の少なくとも1つの糖鎖の修飾でありうる少なくとも1つの追加の修飾を有するものが含まれる。遺伝的に改変されたアミノ酸がさらに修飾されたものであってもよい。当然、この目的に有用な組換え型組織保護サイトカイン分子は、天然のエリスロポエチン分子と比較して、該分子のアミノ酸部分に複数の修飾を加えたもの、該分子の糖鎖部分に複数の修飾を加えたもの、または少なくとも該分子のアミノ酸部分に第2の修飾と該分子の糖鎖部分に少なくとも1つの修飾を加えたもののような、複数の修飾を加えたものでありうる。組換え型組織保護サイトカイン分子は、天然分子と比較して、応答性哺乳動物細胞の機能もしくは生存能を保護、維持、増強または回復する能力を保持するが、上記望ましい特性に関係のない組換え型組織保護サイトカインの他の性質はなくてもよい。好適な実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは赤血球産生作用をもたない。

20

【0020】

別の実施形態においては、組換え型組織保護サイトカインをフコシル化によって修飾して、糖タンパク質のグリコシル化パターンを変えることができる。

【0021】

本発明の一実施形態は、ヒト・エリスロポエチン突然変異タンパク質である上記の組換え型組織保護サイトカインに関する。本発明の別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインはヒト・フェニルグリオキサールエリスロポエチン突然変異タンパク質である。本発明の別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインはヒト・アジアロエリスロポエチン突然変異タンパク質である。

30

【0022】

一実施形態においては、上記の組換え型組織保護サイトカインは、応答性哺乳動物細胞、組織または器官の機能または生存能の保護、維持、増強または回復からなる群より選択される少なくとも1つの応答性細胞保護活性を有する。このような実施形態において、応答性哺乳動物細胞は神経、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管、内皮、精巣、卵巣、子宮内膜の細胞、または幹細胞を含む。他の実施形態では、前記細胞が光受容器、神経節、双極細胞、水平細胞、無軸索細胞、ミュラー細胞、心筋層、ペースメーカー、洞房結節、洞結節、房室結節、ヒス束、肝細胞、星細胞、クップファー細胞、血管間膜細胞、杯細胞、腸腺、腸内分泌線、球状帯細胞、線維束、網状帯細胞、クロム親和細胞、周皮細胞、ライディヒ細胞、セルトーリ細胞、精子、グラーフ卵胞、原始卵胞、子宮内膜間質細胞、または子宮内膜細胞を含む。

40

【0023】

本発明の別の態様によれば、上記の組換え型組織保護サイトカインは内皮細胞関門を横切ることができる。関連する実施形態において、内皮細胞関門は血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門、血液胎盤関門、血液心臓関門、血液腎臓関門、および血液子宮関門を含む。

【0024】

50

本発明の別の実施形態では、上記の組換え型組織保護サイトカインがさらに修飾される。一実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、以下のサイトカインからなる群より選択される：i) シアル酸成分の数が減少しているかまたはシアル酸成分が存在しないサイトカイン、ii) N結合型またはO結合型糖鎖の数が減少しているかまたは前記糖鎖が存在しないサイトカイン、iii) 天然サイトカインを少なくとも1種のグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量が低下しているサイトカイン、iv) 少なくとも1個以上の酸化された糖鎖を有するサイトカイン、v) 化学的に還元されている少なくとも1個以上の酸化された糖鎖を有するサイトカイン、vi) 少なくとも1個以上の修飾されたアルギニン残基を有するサイトカイン、vii) 少なくとも1個以上の修飾されたリシン残基を有するかまたはサイトカイン分子のN末端アミノ基の修飾を有するサイトカイン、viii) 少なくとも1個以上の修飾されたチロシン残基を有するサイトカイン、ix) 少なくとも1個以上の修飾されたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を有するサイトカイン、x) 少なくとも1個以上の修飾されたトリプトファン残基を有するサイトカイン、xi) 少なくとも1個のアミノ酸基が除去されているサイトカイン、xii) サイトカイン分子中の少なくとも1つのシスチン結合の少なくとも1つの開裂を有するサイトカイン、xiii) トランケート型サイトカイン、xiv) 少なくとも1つのポリエチレングリコール分子が結合されているサイトカイン、xv) 少なくとも1つの脂肪酸が結合されているサイトカイン、xvi) 非哺乳動物細胞において組換え型サイトカインを発現させることによって非哺乳動物グリコシル化パターンを有するサイトカイン、およびxvii) 精製を容易にするためにヒスチジンでタグ付けされたアミノ酸を少なくとも1個有するサイトカイン。

10

20

【0025】

一実施形態において、本発明の組換え型組織保護サイトカインはシアル酸成分の数が減少しているか、またはシアル酸成分をもたない。好ましい実施形態では、組換え型組織保護サイトカインはエリスロポエチンのアシアロ形態（すなわち、シアル酸成分をもたない）であり、最も好ましくは、ヒト・アシアロエリスロポエチンである。別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13個のシアル酸成分を有する。シアル化に利用可能な部位の数は、組換え型組織保護サイトカインに1個以上の改変または修飾されたアミノ酸を存在させることで変えることができる。したがって、本発明は、組換え型組織保護サイトカインが低シアル化または高シアル化されている実施形態を包含する。好ましい態様では、エリスロポエチン突然変異タンパク質は天然エリスロポエチンに存在する14個のシアル酸成分より多いシアル酸成分を含む。

30

【0026】

一実施形態において、組換え型組織保護サイトカインはN結合型糖鎖をもたないエリスロポエチンである。別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインはN結合型糖鎖の数が減少しているエリスロポエチンである。一実施形態において、組換え型組織保護サイトカインはO結合型糖鎖をもたないエリスロポエチンである。別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインはO結合型糖鎖の数が減少しているエリスロポエチンである。

【0027】

別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインは糖タンパク質のグリコシル化パターンを変えるためにフコシル化により修飾されうる。

40

【0028】

さらに別の実施形態においては、組換え型組織保護サイトカインが少なくとも1種のグリコシダーゼで処理される。別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインは少なくとも1種のグリコシダーゼで処理することによって少なくとも糖鎖の含有量が低下している。

【0029】

さらに別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインの糖鎖部分は、非哺乳動物細胞において組換え型エリスロポエチンを発現させることによって、少なくとも非哺乳動物グリコシル化パターンを有する。好ましい実施形態では、組換え型組織保護サイトカインを昆虫細胞、植物細胞、細菌細胞、または酵母細胞において発現させる。

50

【0030】

さらに別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは少なくとも1つの酸化された糖鎖をさらに有し、かかる糖鎖は化学的に還元されてもよい。好ましい実施形態では、組換え型組織保護サイトカインが過ヨウ素酸塩で酸化されたエリスロポエチンである。特定の実施形態では、過ヨウ素酸塩で酸化されたエリスロポエチンがシアノ水素化ホウ素ナトリウムで化学的に還元される。

【0031】

さらに別の実施形態において、上記用途のための組換え型組織保護サイトカインは少なくとも1個の修飾されたアルギニン残基を有する。一実施形態では、組換え型組織保護サイトカインが1個以上のアルギニン残基上にR-グリオキサル成分を有し、ここでRはアリーールまたはアルキル基である。さらに別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインがフェニルグリオキサル-エリスロポエチンである。さらに別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインが、2,3-ブタンジオンおよびシクロヘキサジオンを含むがこれらに限定されないピシナルジケトンとの反応によりアルギニン残基を修飾したエリスロポエチンである。さらに別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインがアルギニン残基を3-デオキシグルコソンと反応させたエリスロポエチンである。

【0032】

さらに別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは少なくとも1個の修飾されたリシン残基またはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基の修飾（リシン残基またはN末端アミノ基をアミノ基修飾剤と反応させることにより得られるような修飾）を含む。修飾されたリシン残基をさらに化学的に還元してもよい。一つの好ましい実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは1個以上のリシン基を介してピオチン化、カルバミル化、またはアシル化（例えば、アセチル化）される。別の好ましい実施形態では、リシンをアルデヒドまたは還元糖と反応させてイミンを形成し、このイミンをシアノ水素化ホウ素ナトリウムで還元してグルシトリルリシンのようなN-アルキル化リシンを形成することにより安定化することができ、また、還元糖の場合には -デオキシ- -フルクトシルリシンのような -デオキシ- -アミノ糖を形成するための Amadori または Heyns 転移により安定化することができる。別の好ましい実施形態では、リシン基を、例えばシアネートイオンとの反応によりカルバミル化（カルバモイル化）したり、アルキル-イソシアネート、アリーール-イソシアネート、またはアリーールイソチオシアネートによりそれぞれアルキル-カルバミル化、アリーール-カルバミル化、またはアリーール-チオカルバミル化したり、あるいは、反応性のアルキルまたはアリーールカルボン酸誘導体との反応（例えば、無水酢酸、無水コハク酸、または無水フタル酸との反応）によりアシル化することができる。少なくとも1個のリシン基はまた、トリニトロベンゼンスルホン酸または好ましくはその塩との反応により修飾されたトリニトロフェニルであってもよい。別の実施形態では、グリオキサル誘導体との反応（例えば、グリオキサル、メチルグリオキサル、または3-デオキシグルコソンとの反応）によりリシン残基を修飾して、対応する -カルボキシアルキル誘導体を形成してもよい。関連する実施形態において、カルバミル化サイトカインは、 -N-カルバモイルエリスロポエチン、N- -カルバモイルエリスロポエチン、 -N-カルバモイル、N- -カルバモイルエリスロポエチン、 -N-カルバモイルアシアロエリスロポエチン、N- -カルバモイルアシアロエリスロポエチン、 -N-カルバモイル、N- -カルバモイルアシアロエリスロポエチン、 -N-カルバモイルハイポシアロエリスロポエチン、N- -カルバモイルハイポシアロエリスロポエチン、および -N-カルバモイル、N- -カルバモイルハイポシアロエリスロポエチンを含む。さらに別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインが少なくとも1個のアシル化リシン残基を含む。さらに別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインが少なくとも1個のアセチル化リシン残基を含む。関連する実施形態において、アセチル化サイトカインは、 -N-アセチルエリスロポエチン、N- -アセチルエリスロポエチン、 -N-アセチル、N- -アセチルエリスロポエチン、 -N-アセチルアシアロエリスロポエチン、N- -アセチルアシアロエリスロポエチン、 -N-アセチル、N- -アセチルアシアロエリスロポエチン、 -N-アセチルハイポシアロエ

10

20

30

40

50

リスロポエチン、N- -アセチルハイポシアロエリスロポエチン、 -N-アセチル,N- -アセチルハイポシアロエリスロポエチン、 -N-アセチルハイパーシアロエリスロポエチン、N- -アセチルハイパーシアロエリスロポエチン、 -N-アセチル,N- -アセチルハイパーシアロエリスロポエチンを含む。

【0033】

さらに別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインはスクシニル化されたりリン残基を含む。関連する実施形態において、スクシニル化リシンは、 -N-スクシニルエリスロポエチン、N- -スクシニルエリスロポエチン、 -N-スクシニル,N- -スクシニルエリスロポエチン、 -N-スクシニルアシアロエリスロポエチン、N- -スクシニルアシアロエリスロポエチン、 -N-アセチル,N- -アセチルアシアロエリスロポエチン、 -N-スクシニルハイポシアロエリスロポエチン、N- -スクシニルハイポシアロエリスロポエチン、 -N-スクシニル,N- -スクシニルハイポシアロエリスロポエチン、 -N-スクシニルハイパーシアロエリスロポエチン、N- -スクシニルハイパーシアロエリスロポエチン、 -N-スクシニル,N- -スクシニルハイパーシアロエリスロポエチンを含む。

10

【0034】

一実施形態において、組換え型組織保護サイトカインの少なくとも1個のチロシン残基は、芳香環位置で求電子試薬により、例えばニトロ化またはヨウ素化により修飾される。関連する実施形態では、上記の組換え型組織保護サイトカインは2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムまたは他のその塩により修飾されたりリン残基を少なくとも1個含む。

20

【0035】

別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは少なくとも1個のニトロ化またはヨウ素化されたチロシン残基を含む。

【0036】

別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、カルボジイミドと反応させ続いてアミンと反応させたアスパラギン酸またはグルタミン酸残基を含む。関連する実施形態では、アミンがグリシニアミドである。

【0037】

一実施形態では、組換え型組織保護サイトカインの少なくともトリプトファン残基が、例えばn-ブロモスクシンイミドまたはn-クロロスクシンイミドとの反応により、修飾される。

30

【0038】

別の実施形態では、少なくとも1個のエリスロポエチンアミノ基が除去されている組換え型組織保護サイトカインが提供され、該アミノ基は、例えばニンヒドリンと反応させた後、生じたカルボニル基をホウ水素化物との反応により還元することで除去される。

【0039】

さらに別の実施形態では、ジチオトレイトールなどの還元剤と反応させた後、続いてスルフヒドリルをヨードアセトアミド、ヨード酢酸または他の求電子試薬と反応させてジスルフィド結合の再形成を防ぐことによって、分子中のシステイン結合の少なくとも1つの開裂を少なくとも有する組換え型組織保護サイトカインが提供される。

40

【0040】

さらに別の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、例えばトリプトファン残基の後ろを切断するために、特定の残基を標的とする限定的な化学的タンパク質加水分解に供される。このようにして得られた組換え型組織保護サイトカインの断片は本明細書中に包含される。

【0041】

上記のように、本明細書に記載の目的に有用な組換え型組織保護サイトカインは、遺伝的に改変されたアミノ酸に加えて、少なくとも1つの上記化学的修飾をもつことができるが、上記修飾を2以上含んでいてもよい。サイトカイン分子の糖鎖部分に1つの修飾とアミノ酸部分に1つの修飾を有する組換え型組織保護サイトカインの例としては、そのリシン

50

残基がビオチン化、アシル化（アセチル化）またはカルバミル化されているアシアロエリ
スロポエチンがある。組換え型組織保護サイトカインは脂肪酸鎖の付加によって修飾され
ていてもよい。別の実施形態では、組換え型組織保護サイトカインをポリエチレングリコ
ール(PEG)の付加によって修飾すると、PEG化された組織保護サイトカインが得られる。

【0042】

本発明の一つの態様によれば、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインを含
むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子が提供される。
一実施形態において、単離された核酸分子は、配列番号208のベクター構築物のヌクレオ
チド残基5461から6041、配列番号209のヌクレオチド残基5461から6041、配列番号210のヌ
クレオチド残基5461から6041、配列番号211のヌクレオチド残基5461から6041、または配
列番号212のヌクレオチド残基5461から6041のヌクレオチド配列を含んでなる。

10

【0043】

本発明の一実施形態においては、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインを
含むまたはからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（すなわち、cDNA、イン
トロンが介在するまたは介在しないヌクレオチド配列）を含む単離された核酸分子が提供
されるが、ただし、前記核酸分子は以下のアミノ酸置換の1以上を含む組換え型組織保護
サイトカインをコードするものではない：I6A、C7A、K20A、P42A、D43A、K45D、K45A、F4
8A、Y49A、K52A、K49A、S100E、R103A、K116A、T132A、I133A、K140A、N147K、N147A、R1
50A、R150E、G151A、K152A、K154A、G158A、C161A、またはR162A。関連する実施形態では
、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインを含むポリペプチドをコードするヌ
クレオチド配列を含む単離された核酸分子が提供されるが、ただし、前記核酸分子は以下
のアミノ酸置換の組合せのいずれかを含む組換え型組織保護サイトカインをコードするも
のではない：N24K/N38K/N83KまたはA30N/H32T。一実施形態において、組換え型組織保護
サイトカインをコードするヌクレオチド配列は、特定の宿主細胞での最適な発現を可能に
する好適なコドンを用いて合成される。そのような好適なコドンは植物、細菌、酵母、哺
乳動物、真菌、または昆虫の細胞内で発現させるために最適化することができる。

20

【0044】

本発明はまた、前記核酸分子を含有するベクターを提供する。本発明はまた、前記核酸
分子およびその核酸分子に機能的に連結された少なくとも1つの調節領域を含有する発現
ベクターを提供する。一実施形態において、前記ベクターはpCiNeoベクターである。別の
実施形態において、本発明は前記発現ベクターを含む細胞を提供する。さらに別の実施形
態では、前記核酸分子を含む遺伝子操作された細胞を提供する。

30

【0045】

別の実施形態において、本発明は、1以上の前記組換え型組織保護サイトカインを含有
する、医薬組成物をはじめとする組成物を包含する。

【0046】

本発明の別の態様によれば、ヘマトクリットの上昇、血管収縮作用、血小板の高活性化
、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血
球産生作用を欠失している、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインを含有す
る医薬組成物が提供される。本発明の別の態様によれば、ヘマトクリットの上昇、血管収
縮作用、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択さ
れる少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失していない、本明細書に記載した組換え型組
織保護サイトカインを含有する医薬組成物が提供される。前記サイトカインは、哺乳動物
の応答性細胞、組織または器官の機能または生存能の保護、維持、増強または回復からな
る群より選択される少なくとも1つの応答性細胞保護活性を有する。前記医薬組成物に含
まれる組換え型組織保護サイトカインは、以下の改変（すなわち、置換）の少なくとも1
つを有する配列番号10のアミノ酸配列を含みうる（改変または改変の組合せはそれぞれが
別の配列識別番号を指定されている）：i) 配列番号10の残基45にアスパラギン酸、およ
び残基100にグルタミン酸（配列番号106）；ii) 配列番号10の残基30にアスパラギン、残基
32にトレオニン（配列番号107）；iii) 配列番号10の残基45にアスパラギン酸、残基150に

40

50

グルタミン酸 (配列番号108); iv) 配列番号10の残基103にグルタミン酸、および残基108にセリン (配列番号109); v) 配列番号10の残基140にアラニンおよび残基52にアラニン (配列番号110); vi) 配列番号10の残基140にアラニン、残基52にアラニン、残基45にアラニン (配列番号111); vii) 配列番号10の残基97にアラニン、および残基152にアラニン (配列番号112); viii) 配列番号10の残基97にアラニン、残基152にアラニン、残基45にアラニン (配列番号113); ix) 配列番号10の残基97にアラニン、残基152にアラニン、残基45にアラニン、および残基52にアラニン (配列番号114); x) 配列番号10の残基97にアラニン、残基152にアラニン、残基45にアラニン、残基52にアラニン、残基140にアラニン、残基154にアラニン、残基24にリシン、残基38にリシン、残基83にリシン、残基24にリシンおよび残基15にアラニン (配列番号116); xii) 配列番号10の残基24にリシン、残基38にリシン、および残基83にリシン (配列番号117); または xiv) 配列番号10の残基24にリシンおよび残基15にアラニン (配列番号118)。

10

【0047】

本発明の別の態様によれば、哺乳動物の応答性細胞ならびにそれらの関連する細胞、組織および器官の機能または生存能を保護、維持、増強、または回復するための医薬組成物が提供され、前記医薬組成物は、治療に有効な量の、少なくとも1つの以下のアミノ酸残基置換を有する組換え型組織保護サイトカインを含有する (改変または改変の組合せはそれぞれが別の配列識別番号を指定されている) : 配列番号10の残基152にトリプトファン (配列番号98); 配列番号10の残基14にアラニンおよび残基15にアラニン (配列番号119); 配列番号10の残基6にアラニン (配列番号15); 配列番号10の残基7にアラニン (配列番号16); 配列番号10の残基43にアラニン (配列番号42); 配列番号10の残基42にアラニン (配列番号41); 配列番号10の残基48にアラニン (配列番号49); 配列番号10の残基49にアラニン (配列番号50); 配列番号10の残基32にトレオニン (配列番号35); 配列番号10の残基133にアラニン (配列番号83); 配列番号10の残基134にアラニン (配列番号84); 配列番号10の残基147にアラニン (配列番号90); 配列番号10の残基148にアラニン (配列番号92); 配列番号10の残基150にアラニン (配列番号94); 配列番号10の残基151にアラニン (配列番号96); 配列番号10の残基158にアラニン (配列番号102); 配列番号10の残基161にアラニン (配列番号104); または配列番号10の残基162にアラニン (配列番号105)。

20

【0048】

一実施形態において、本明細書に記載した医薬組成物は、経口、鼻腔内、または非経口投与のために製剤化される。別の実施形態では、医薬組成物が灌流溶液として製剤化される。

30

【0049】

特定の実施形態において、哺乳動物の応答性細胞ならびにそれらの関連する細胞、組織および器官の機能または生存能を保護、維持、増強、または回復するための本発明の医薬組成物は、天然ヒト・エリスロポエチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基の少なくとも1つの置換を含む組換え型組織保護サイトカインを治療に有効な量で含有する。

【0050】

他の実施形態において、哺乳動物の応答性細胞ならびにそれらの関連する細胞、組織および器官の機能または生存能を保護、維持、増強、または回復するための本発明の医薬組成物は、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用 (血管収縮 / 血管拡張)、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加のような赤血球産生活性または作用を少なくとも1つ欠失しているが細胞保護活性を有する組換え型組織保護サイトカインを治療に有効な量で含有する。

40

【0051】

他の実施形態において、哺乳動物の応答性細胞ならびにそれらの関連する細胞、組織および器官の機能または生存能を保護、維持、増強、または回復するための本発明の医薬組成物は、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用 (血管収縮 / 血管拡張)、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加のような赤血球産生活性または作用を少なくと

50

も1つ有しかつ細胞保護活性を有する組換え型組織保護サイトカインを治療に有効な量で含有する。

【0052】

本発明の一つの態様によれば、哺乳動物の身体から単離した細胞、組織または器官の生存能を保護、維持、または増強する方法が提供され、この方法は、前記細胞、組織または器官を、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用（血管収縮／血管拡張）、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失しているエリスロポエチンからなる組換え型組織保護サイトカインを含有する医薬組成物にさらすことを含んでなる。特定の実施形態においては、前記の保護が骨髄に影響を及ぼさない。

10

【0053】

本発明はまた、哺乳動物の身体から単離した細胞、組織または器官の生存能を保護、維持、または増強する方法を提供し、この方法は、前記細胞、組織または器官を、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用（血管収縮／血管拡張）、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失している、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインを含有する医薬組成物にさらすことを含んでなる。

【0054】

本発明はさらに、組織損傷からの保護用の、組織損傷の防止用の、ならびに哺乳動物における組織および組織機能の回復および若返り用の医薬組成物を製造するための、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用（血管収縮／血管拡張）、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失している、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインの使用を提供する。一実施形態において、前記損傷は痙攣障害、多発性硬化症、発作、低血圧、心停止、虚血、心筋梗塞、炎症、加齢による認知機能の喪失、放射線障害、脳性麻痺、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、リー病、AIDS痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、アルコール中毒症、気分障害、不安障害、注意欠陥障害、自閉症、クロイツフェルト-ヤコブ病、脳脊髄の損傷もしくは虚血、心肺バイパス、慢性心不全、黄斑変性、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、緑内障、網膜虚血、または網膜損傷により引き起こされる。

20

【0055】

本発明の別の態様によれば、哺乳動物において内皮細胞関門を越える分子のトランスサイトーシスを促進するための方法が提供され、この方法は、ヘマトクリットの上昇、血圧の上昇、血小板の高活性化、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの活性を欠失している、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインと会合している前記分子を含有する組成物を、前記哺乳動物に投与することを含んでなる。一実施形態において、前記会合は前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定した共有結合、または非共有結合である。本発明の別の態様によれば、哺乳動物において内皮細胞関門を越える分子のトランスサイトーシスを促進するための方法が提供され、この方法は、ヘマトクリットの上昇、血圧の上昇、血小板の高活性化、および栓球産生の増加からなる群より選択される活性を有する、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインと会合している前記分子を含有する組成物を、前記哺乳動物に投与することを含んでなる。一実施形態において、前記会合は前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定した共有結合、または非共有結合である。別の実施形態では、内皮細胞関門が血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門、血液心臓関門、血液腎臓関門、および血液胎盤関門からなる群より選択される。さらに別の実施形態では、前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌剤、抗ウイルス剤、放射性医薬品、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、免疫抑制剤、染料、マーカー、または抗癌剤である。

30

40

【0056】

本発明の別の態様によれば、内皮細胞関門を越えるトランスサイトーシスにより分子を

50

輸送するための組成物が提供され、前記組成物は、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用（血管収縮／血管拡張）、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失している、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインと会合している前記分子を含有する。本発明の別の態様によれば、内皮細胞閉門を越えるトランスサイトーシスにより分子を輸送するための組成物が提供され、前記組成物は、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用（血管収縮／血管拡張）、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を有する、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインと会合している前記分子を含有する。一実施形態において、前記会合は前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定した共有結合、または非共有結合である。別の実施形態では、前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌剤、抗ウイルス剤、放射性医薬品、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体、免疫抑制剤、染料、マーカー、または抗癌剤である。

10

【0057】

本発明はまた、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用（血管収縮／血管拡張）、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失している、本明細書に記載した組換え型組織保護サイトカインの使用を提供する。一実施形態において、前記会合は前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定した共有結合、または非共有結合である。別の実施形態では、前記分子が、受容体アゴニストもしくはアンタゴニストホルモン、神経栄養因子、抗菌剤、抗

20

【0058】

したがって、本発明は、天然エリスロポエチンの少なくとも1個のアミノ酸に改変を加えた、上記のような細胞保護活性を有する組換え型組織保護サイトカインを細胞保護のために使用することに関する。このような細胞保護活性としては、制限するものではないが、神経保護活性がある。本発明はさらに、応答性細胞、組織または器官の治療、特にそのような応答性細胞、組織または器官が関係する症状または疾患の治療のための上記組換え型組織保護サイトカインの使用に関する。そのような一実施形態において、組換え型組織保護サイトカインはヘマトクリットの上昇、血管活性作用（血管収縮／血管拡張）、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を有する。本発明の組換え型組織保護サイトカインは天然エリスロポエチンの三次元コンフォメーションを維持することが好ましい。組換え型組織保護サイトカインは赤血球産生作用があってもなくてもよい。

30

【0059】

本発明の一実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、Hisタグ（6×His残基）がN末端に融合している組換えタンパク質として作製される。特定の実施形態では、追加のアミノ酸配列をスペーサーとして加えてもよい。具体的な実施形態において、本発明のヒスチジンタグ付き組換え型組織保護サイトカインは、K45D-6xHisおよびS100E-6xHisを含むが、これらに限らない。

40

【0060】

本発明の他の態様において、上記の組換え型組織保護サイトカインは、応答性哺乳動物細胞ならびにそれらの関連する細胞、組織および器官の機能または生存能を保護、維持、増強または回復するための細胞、組織および器官のex vivo治療のための医薬組成物を調製するのに使用することができる。このようなex vivo治療は、例えば、自己移植であろうと異種移植であろうと、移植用の細胞、組織または器官の保存に有用である。細胞、組織または器官がドナーまたはレシピエントの脈管構造と一体化されない間中、細胞の機能を維持するために、エリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインを含む溶液中に細胞、組織または器官を入れたり、脈管構造もしくは他の手段を介して灌流液を器官の中に徐々にしみ込ませたりしてもよい。灌流液の投与は、回収された

50

器官およびレシピエントに行うだけでなく、器官を回収する前にドナーに行ってもよい。さらに、組換え型組織保護サイトカインの上記使用は、細胞、組織または器官が個体の脈管構造から単離されて一定期間にわたって実質的に *ex vivo* で存在するときにはいつでも有用である。ここで、「単離された」という用語は、細胞、組織、器官もしくは身体部分のまたはその脈管構造の拘束または締めつけ（特に、心肺バイパス手術などの外科手術中に行われるもの）；細胞、組織、器官または身体部分の脈管構造のバイパス迂回；哺乳動物の身体からの細胞、組織、器官または身体部分の摘出（例えば、異種移植前または自己移植前および自己移植中に行われるもの）；あるいは、細胞、組織、器官または身体部分の外傷性切断を意味する。このように、本発明のこの態様は、*in situ* および *ex vivo* の両方でのエリスロポエチン突然変異タンパク質を用いた灌流に関する。*ex vivo* において、

10

20

30

40

50

【0061】

さらに他の態様において、本発明は、応答性細胞もしくは組織を含む、哺乳動物の身体から単離された細胞、組織、器官または身体部分の生存能を保護、維持、増強または回復するための方法に関する。この方法は少なくとも、上記生存能を保護、維持、増強または回復するのに効果的な時間にわたり、単離した哺乳動物細胞、組織、器官または身体部分を、ある量のエリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインに曝露することを含む。非限定的な例において、「単離された」とは、細胞、組織、器官

【0062】

非限定的な例として、上記 *ex vivo* 応答性細胞もしくは組織は、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣、膵臓、骨、骨髄、皮膚、臍帯血、もしくは子宮内膜の細胞または組織であるか、またはこれらを含むものである。応答性細胞のこれらの例は、単なる例示にすぎない。

【0063】

上記方法および用途の全ては好ましくはヒトに適用されるが、あらゆる哺乳動物（例えば、ペット、家畜、牧畜および動物園の動物などが挙げられるが、これらに限定されない）にも有用である。上記医薬組成物の投与経路としては、経口、静脈内、鼻腔内、局所、腔内、吸入または非経口投与が挙げられ、非経口投与には静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、粘膜下または皮内が含まれる。*ex vivo* で使用する場合、灌流液または浴液が好ましい。これは、脈管構造の単離された部分を *in situ* で灌流することを含む。

【0064】

本発明のさらに別の態様において、上記の組換え型組織保護サイトカインは、機能不全の一因となる疾患または症状の発症後に投与したときにその機能不全細胞、組織もしくは器官を回復させるための医薬組成物を調製するのに有用である。非限定的な例として、組換え型組織保護サイトカインを含む医薬組成物の投与は、過去に脳外傷を負った動物において、その最初の外傷からしばらく経った後（例えば1日、3日、5日、1週間、1ヶ月後またはそれ以上）に投与したときでさえ、認知機能を回復させる。本発明は、最初の外傷から段階的に生じる細胞および組織のその後の外傷を治療し（すなわち、その症状もしくは

結果を改善または逆転し)かつ予防する(すなわち、その発症を遅らせ、阻害し、または停止する)ための医薬組成物を包含する。このような用途に有用な組換え型組織保護サイトカインには、特定の上記組換え型組織保護サイトカインがどれも含まれる。応答性細胞に利益をもたらすことができるあらゆる形態の組換え型組織保護サイトカインが、本発明のこの態様に包含される。

【0065】

さらに別の実施形態において、本発明は、機能不全の一因となる疾患または症状の発症後に投与したときにその機能不全細胞、組織または器官を回復させるための上記組換え型組織保護サイトカインの使用を提供する。非限定的な例として、組換え型組織保護サイトカインを含む医薬組成物の投与方法は、過去に脳に外傷を負った動物において、その外傷がおさまってからしばらく経った後(例えば3日、5日、1週間、1ヶ月またはそれ以上)に投与された場合であっても、認知機能を回復させる。組換え型組織保護サイトカインおよびそのさらなる修飾体は本明細書において上述したとおりである。応答性細胞に利益をもたらすことができるあらゆる形態の組換え型組織保護サイトカインが、本発明のこの態様に包含される。

10

【0066】

本発明のさらに他の態様においては、本明細書中で先に記載したエリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインに分子を会合させた組成物を投与することによって、哺乳動物において内皮細胞関門を越える分子のトランスサイトーシスを促進する方法が提供される。輸送しようとする分子と組換え型組織保護サイトカインとの間の会合は、例えば、前記分子に対する結合部位との不安定な共有結合、安定な共有結合、または非共有結合でありうる。組換え型組織保護サイトカインと輸送しようとするタンパク質が融合ポリペプチドとして発現されてもよい。内皮細胞関門は、血液脳関門、血液心臓関門、血液腎臓関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門、および血液胎盤関門でありうる。本発明の方法により輸送するのに適した分子としては、成長ホルモンなどのホルモン、抗生物質および抗癌剤が挙げられる。

20

【0067】

本発明のさらなる態様は、哺乳動物において内皮細胞関門を越える分子のトランスサイトーシスを促進するための組成物を提供することである。前記組成物は、前記分子を上記のような組換え型組織保護サイトカインと会合させたものを含有する。

30

【0068】

本発明のさらに他の態様では、哺乳動物において内皮細胞関門を越える分子のトランスサイトーシスを促進するための医薬組成物を調製するのに上記組換え型組織保護サイトカインのどれもが有用である。前記組成物は、前記分子が上記のような組換え型組織保護サイトカインと会合したものを含有する。

【0069】

会合は、例えば、前記分子に対する結合性部位との不安定な共有結合、融合ポリペプチド、安定な共有結合、または非共有結合でありうる。内皮細胞関門は、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門、および血液胎盤関門であってもよい。本発明の方法により輸送するのに適した分子としては、成長ホルモンなどのホルモン、神経栄養因子、抗生物質、抗ウイルス剤、もしくは抗真菌剤(例えば、通常は脳や他の関門のある器官から排除されるもの)、ペプチド放射性薬剤、アンチセンス薬物、生物活性物質に対する抗体、医薬品、染料、マーカー、および抗癌剤が挙げられる。

40

【0070】

本発明のこれらの態様および他の態様は、添付の図面および以下の詳細な説明を参照することによりさらによく理解されよう。

【0071】

4. 図面の簡単な説明

図1は、抗エリスロポエチン抗体を用いて染色した、正常ヒト脳の薄い切片におけるエリスロポエチン受容体の分布を示す。

50

【0072】

図2は、図1の画像をより高い倍率で観察したものである。

【0073】

図3は、金で標識した第二抗体を用いた、エリスロポエチン受容体の超ミクロの分布を示す。

【0074】

図4は、図3と同様に調製した、ヒト脳毛細管の管腔側および非管腔側の表面にある高密度のエリスロポエチン受容体を示す。

【0075】

図5は、非経口投与されたエリスロポエチンの脳脊髄液中へのトランスロケーションを示す。 10

【0076】

図6Aおよび6Bは、エリスロポエチンならびに組換え型組織保護サイトカイン（K45DおよびS100E組換え型組織保護サイトカインを含む）についてのSK-N-SH神経芽腫細胞神経保護アッセイ（ロテノンに対する）の結果を示す。グラフのy軸は吸光度値を示し、データは2回反復測定の平均±範囲である。図6Aのグラフは、K45DおよびS100Eサンプル内の細胞の生存能が維持されたことを明確に示しており、それらの細胞保護作用を実証している。図6Bは、hEP0-6xHisTag-PCiNeoのプラスミド地図を示す。

【0077】

図7は、血清欠乏P19細胞の生存能に及ぼすエリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンのin vitro効力を比較した図である。 20

【0078】

図8は、血清欠乏P19細胞の生存能に及ぼすエリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンのin vitro効力を比較する別の実験を示す。

【0079】

図9は、ラット限局性大脳虚血モデルにおけるエリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの保護を示す。

【0080】

図10は、虚血発作モデルにおける、中大脳動脈閉塞におけるヒト・エリスロポエチンおよびヒト・アジアロエリスロポエチンの効力を比較する用量応答を示す。 30

【0081】

図11は、P19アッセイにおけるヨウ素化エリスロポエチンの活性を示す。

【0082】

図12は、P19アッセイにおけるビオチン化エリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの効果を示す。

【0083】

図13は、血清欠乏P19細胞の生存能に及ぼすエリスロポエチンおよびフェニルグリオキサル改変エリスロポエチンのin vitro効力を比較した図である。

【0084】

図14は、水中毒アッセイにおける組織保護サイトカインの効果を示す。 40

【0085】

図15は、エリスロポエチンによる移植用に調製された心臓の機能維持を示す。

【0086】

図16は、一時的な血管閉塞の後の虚血損傷からのエリスロポエチンによる心筋層の保護を示す。

【0087】

図17A、17B、17Cおよび17Dは、ラット緑内障モデルにおけるエリスロポエチン治療の効力を示す。

【0088】

図18は、ラット緑内障モデルにおけるエリスロポエチンによる網膜機能の保存の程度を 50

示す。

【0089】

図19は、脳外傷を負った5日後にエリスロポエチン投与を開始することによる、脳外傷後の認知機能の回復を示す。

【0090】

図20は、脳外傷を負った30日後にエリスロポエチン投与を開始することによる、脳外傷後の認知機能の回復を示す。

【0091】

図21は、大脳毒性のカイニン酸モデルにおけるヒト・アジアロエリスロポエチンの効力を示す。

【0092】

図22は、ラット脊髄損傷モデルにおける組織保護サイトカインの効力を示す。

【0093】

図23は、ウサギ脊髄損傷モデルにおける組織保護サイトカインの効力を示す。

【0094】

図24A、24Bおよび24Cは、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した大脳皮質層の冠状断面を示す。

【0095】

図25A、25Bおよび25Cは、GFAP抗体で染色した、梗塞領域に隣接する前頭皮質の冠状断面を示す。

【0096】

図26Aおよび26Bは、OX-42抗体で染色した大脳皮質層の冠状断面を示す。

【0097】

図27Aおよび27Bは、OX-42抗体で染色した、梗塞領域に隣接する大脳皮質層の冠状断面を示す。

【0098】

図28は、EAEモデルにおける炎症に対するエリスロポエチンの効力を示す。

【0099】

図29は、EAEモデルにおける炎症に対するデキサメタゾンおよびエリスロポエチンの影響を示す。

【0100】

図30Aおよび30Bは、エリスロポエチンが神経細胞死と関連した炎症を抑制することを示す。

【0101】

図31は、ヒト・エリスロポエチンならびに組換え型組織保護サイトカインR130EおよびR150Eが、NMDA処理前に初代海馬神経細胞培養物に添加したとき、NMDAにより誘導された細胞死を効果的に減ずることを示す。R103E (5nM)で処理した細胞は、ピヒクル対照細胞と比較して有意に低い細胞死を示した(p=0.01)。R150E (5nM)で処理した細胞は、溶媒対照細胞と比較して細胞死を約20%減少させた(p=0.001)。統計には分散分析に加えてTukeyのポストホックテストを用いた。

【0102】

図32は、P19細胞における血清除去からの神経細胞保護を示す。Epo、EpoWTおよび組換え型組織保護サイトカインS100Eで前処理した細胞の場合は、アポトーシス細胞の割合が減少した。Epoで処理した細胞は、未処理対照細胞と比較してアポトーシス細胞死の約20%減少を示した。EpoWTおよびS100Eで処理した細胞は両方とも、未処理対照細胞と比較してアポトーシス細胞死の約10%減少を示した。

【0103】

図33Aおよび33Bは、2つの独立した実験においてNGF除去を受けた分化PC12細胞におけるS100Eとのプレインキュベーションの効果を示す。分化PC12細胞を示した濃度のS100Eで24時間前処理した：図33A (3pM)、図33B (0.00003pM~3pM)。MTTアッセイで生存能を測定し

10

20

30

40

50

た。NGF (100ng/ml)を陽性対照として、また、NGF不含培地 (-NGF)を陰性対照として用いた。図33に示したデータは、陽性対照 (+NGF)に対する生存率%として表される(両実験ともn=8)。一元配置分散分析およびBonferroniポストホックテストを用いることにより、陰性対照細胞 (-NGF)と比較してS100E処理細胞の生存能に統計的に有意な増加が認められる。***p<0.001、*p<0.05。S100Eにより観察された結果は、この検定系において、潜在能力および効力に関してEpoのそれと同様であった。

【0104】

図34A、34Bおよび34Cは、NGF除去を受けた分化PC12細胞におけるEpoとのプレインキュベーションの効果を示す。分化PC12細胞をEpo、S100E、またはカルバミル化Epo (30pM~30nM)で24時間前処理した。化学的に改変されたEpo分子であるAA24496は、UT-7細胞アッセイにおいてEPOより10000倍低い活性を有する。MTTアッセイで生存能を測定した。NGF (100ng/ml)を陽性対照として、また、NGF不含培地 (-NGF)を陰性対照として用いた。

10

【0105】

図35は、UT-7細胞におけるEpo、K45DおよびS100Eの濃度-反応曲線を示す。UT-7細胞にさまざまな濃度のEpo、EpoWT、K45DおよびS100Eを加えた。48時間後にWST-1アッセイで生存能を測定した。データは3つの異なる実験(それぞれ2回ずつ行った)の平均±SDである。曲線は非線形回帰曲線である。

【0106】

図36は、UT-7細胞におけるEpo、R103EおよびR150Eの用量応答曲線を示す。UT-7細胞にさまざまな濃度のEpo、EpoWT、R103EおよびR150Eを加えた。48時間後にWST-1アッセイで生存能を測定した。データは3つの異なる実験(それぞれ2回ずつ行った)の平均±SDである。曲線は非線形回帰曲線である。

20

【0107】

図37は、42日間にわたる、脊髄外傷から回復するラットの歩行運動評価を示すグラフである。グラフからわかるように、S100Eを投与されたラットは損傷からすぐに回復し、対照ラットおよびメチルプレドニゾロンを投与されたラットより全体的に良好な損傷回復を示した。

【0108】

図38は、種々の治療計画についての正常な眼の潜時に対する傷を負った眼の潜時の比を示す。EPOで治療したラットは1.2の潜時を示し、食塩水で治療したラットより良好である。4種の組換え型組織保護サイトカインのそれぞれはEPOと同等かまたはそれより良好な潜時結果をもたらし、R103E、R150EおよびS100Eは、EPOと比べて統計上の改善を示す。

30

【0109】

5. 発明の詳細な説明

本発明は、ムテイン組換え型組織保護サイトカインに関する。特に、本発明は、組換え型組織保護サイトカインムテインをコードする単離された核酸分子を含む組成物、ならびに該核酸分子を含む単離されたおよび/または組換え体の細胞およびベクターを提供する。本発明はさらに、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用(血管収縮/血管拡張)、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失しているムテイン組換え型組織保護サイトカインの単離されたポリペプチドを包含し、前記サイトカインは、哺乳動物の応答性細胞、組織または器官の機能または生存能の保護、維持、増強または回復からなる群より選択される少なくとも1つの応答性細胞保護活性を有する。本発明はまた、本発明の組換え型組織保護サイトカインムテインを用いて、哺乳動物の身体から単離された細胞、組織または器官の生存能を保護、維持または増強するための方法、ならびに疾患および症状を治療し予防する際の前記ムテインの使用を包含する。

40

【0110】

「応答性細胞」とは、エリスロポエチンへの曝露により、機能または生存能が維持、促進、増強もしくは再生されるかまたは何らかの他の方法で恩恵をこうむる哺乳動物細胞を指す。このような細胞の非限定的な例としては、神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎

50

臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巢、卵巣、膵臓、骨、皮膚および子宮内膜の細胞が挙げられる。特に、応答性細胞には、限定するものではないが、以下の細胞が含まれる：神経細胞；プルキンエ細胞；網膜細胞：光受容器（桿体および錐体）、神経節、双極細胞、水平細胞、無軸索細胞、およびミュラー細胞；筋肉細胞；心臓細胞：心筋層、ペースメーカー、洞房結節、洞結節、および接合組織細胞（房室結節およびヒス束）；肺細胞；肝臓細胞：ヘパトサイト、星細胞、およびクップファー細胞；腎臓細胞：血管間膜細胞、腎上皮細胞、および管状間質細胞；小腸細胞：杯細胞、腸腺、および腸内分泌線細胞；副腎皮質細胞：球状帯細胞、線維束、網状帯細胞；副腎髄質細胞：クロム親和細胞；毛細管細胞：周皮細胞；精巢細胞：ライディヒ細胞、セルトーリ細胞、および精子細胞およびそれらの前駆細胞；卵巣細胞：グラーフ卵胞、および原始卵胞細胞；膵臓細胞：ランゲルハンス島、細胞、細胞、細胞、およびF細胞；骨細胞：前骨芽細胞、破骨細胞、および骨芽細胞；皮膚細胞；子宮内膜細胞：子宮内膜間質および子宮内膜細胞、ならびに上記の器官に存在する幹細胞および内皮細胞。さらに、このような応答性細胞および組換え型組織保護サイトカインによりそれらにもたらされる恩恵は、直接的には応答性でない他の細胞またはこのような非応答性細胞を含む組織もしくは器官の細胞を間接的に保護または増強することにまで拡大することができる。応答性細胞の増強により間接的に恩恵をこうむるこれらの他の細胞、組織もしくは器官は、その細胞、組織もしくは器官の一部として、「関連する」細胞、組織および器官として存在する。このように、本明細書中に記載する組換え型組織保護サイトカインの恩恵は、組織または器官（例えば、このような組織に存在する興奮性もしくは神経性組織）の中、またはテストステロンを作る精巢のライディヒ細胞の中に少数もしくは小割合の応答性細胞が存在する結果としてもたらされ得る。一つの態様において、応答性細胞またはその関連する細胞、組織または器官は、興奮性の細胞、組織もしくは器官ではないか、または興奮性の細胞もしくは組織を主に含むものではない。

10

20

【0111】

本発明の方法は、様々な正常および有害な条件下に、哺乳動物の体内において細胞、組織および器官を局所的にもしくは全身的に防御または増強するか、あるいは、他の哺乳動物に移植しようとする細胞、組織および器官を保護するものである。さらに、機能不全の回復または再生ももたらされる。上述したように、隙間のない内皮細胞閉門を通過して脈管構造の遠位にある応答性細胞（および他のタイプの細胞）に対してプラスの影響を發揮するエリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインの能力は、さもなくば動物（ヒトを含む）の細胞および組織に大きなダメージを引き起こし得る様々な症状および疾患を治療および予防する可能性を提供し、さらに、伝統的に利益よりも危険の方が高かったこれまで支持されない外科手術を成功させるものである。最終的な利益のために誘導される意図的な有害条件の継続時間および程度（例えば高用量の化学療法、放射線療法、長時間のex vivo移植生存、および手術により誘導される長時間の虚血など）は、本明細書中に記載される発明を利用することによって可能となる。しかし本発明は、そのようなものに限定されず、1つの態様として、標的となる応答性細胞が内皮細胞閉門または内皮の密着した接合部の存在により脈管構造の遠位に位置する場合の方法または組成物を含むものである。本発明は一般に、組換え型組織保護サイトカインに曝露することにより恩恵を得ることができる応答性細胞ならびに関連する細胞、組織および器官に向けられる。さらに、細胞、組織または器官の機能不全は、急な有害事象（外傷等）を負った後、組換え型組織保護サイトカインへの曝露によって回復または再生させることができる。

30

40

【0112】

したがって、本発明は一般に、上記目的（細胞機能が維持、促進、増強もしくは再生されるか、または他の方法で恩恵を受ける）のための医薬組成物を調製するための組換え型組織保護サイトカインの使用に関する。また本発明は、本明細書中に記載される、有効量の組換え型組織保護サイトカインを哺乳動物に投与することによって細胞機能を維持、増強、促進または再生する方法にも関する。本発明はさらに、細胞、組織または器官を組換え型

50

組織サイトカインに曝露することによって、ex vivoで細胞機能を維持、促進、増強または再生する方法に関する。また本発明は、器官または組織の保存に使用するための、組換え型組織サイトカインを含む灌流液組成物に関する。

【0113】

本発明の種々の方法は、哺乳動物の体内にあるまたは哺乳動物の身体から取り出した応答性細胞に対してプラスの影響または利益を付与するために、少なくとも有効量の組換え型組織サイトカインを含む医薬組成物を特定の経路および曝露時間で利用するものである。意図する治療の標的となる細胞、組織または器官が、内皮細胞関門を越えるために組換え型組織保護サイトカインを必要とする場合、医薬組成物は、内皮細胞関門を通過した後に応答性細胞に対してその望ましい影響を及ぼすことができる濃度の組換え型組織保護サイトカインを含む。エリスロポエチン受容体と相互作用して細胞内で細胞保護活性を調節することができる分子は、本発明の状況において有用である。

10

【0114】

5.1. 本発明の核酸

本発明の核酸分子を含む組換え型組織保護サイトカインには、ヘマトクリットの上昇、血管活性作用（血管収縮／血管拡張）、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失しているか、または前記活性の低下を示すエリスロポエチン突然変異タンパク質を含む組織保護サイトカインをコードする核酸が含まれる。ここで、前記サイトカインは、哺乳動物の応答性細胞、組織または器官の機能または生存能の保護、維持、増強または回復からなる群より選択される少なくとも1つの応答性細胞保護活性を有するものである。本発明の核酸分子を含む組織保護サイトカインには、配列番号10の11位から15位〔配列番号1〕の間、配列番号10の44位から51位〔配列番号2〕の間、配列番号10の100位から108位〔配列番号3〕の間、または配列番号10の146位から151位〔配列番号4〕の間に1個以上の改変されたアミノ酸残基を含む、上記の活性を有するエリスロポエチン突然変異タンパク質をコードする核酸が含まれる。本発明の核酸分子を含む組織保護サイトカインには、配列番号10の次の位置：7、20、21、29、33、38、42、59、63、67、70、83、96、126、142、143、152、153、155、156、または161の1以上の位置に改変されたアミノ酸残基を含む、上記の活性を有するエリスロポエチン突然変異タンパク質をコードする核酸が含まれる。本発明の核酸分子を含む組織保護サイトカインには、1以上の以下の改変を有する配列番号10のアミノ酸配列を含む、上記の活性を有するエリスロポエチン突然変異タンパク質をコードする核酸が含まれる：配列番号10の残基6にアラニン；配列番号10の残基7にアラニン；配列番号10の残基7にセリン；配列番号10の残基10にイソロイシン；配列番号10の残基11にセリン；配列番号10の残基12にアラニン；配列番号10の残基13にアラニン；配列番号10の残基14にアラニン；配列番号10の残基14にグルタミン酸；配列番号10の残基14にグルタミン；配列番号10の残基15にアラニン；配列番号10の残基15にフェニルアラニン；配列番号10の残基15にイソロイシン；配列番号10の残基20にグルタミン酸；配列番号10の残基20にアラニン；配列番号10の残基21にアラニン；配列番号10の残基24にリシン；配列番号10の残基29にセリン；配列番号10の残基29にチロシン；配列番号10の残基30にアスパラギン；配列番号10の残基32にトレオニン；配列番号10の残基33にセリン；配列番号10の残基33にチロシン；配列番号10の残基38にリシン；配列番号10の残基83にリシン；配列番号10の残基42にアスパラギン；配列番号10の残基42にアラニン；配列番号10の残基43にアラニン；配列番号10の残基44にイソロイシン；配列番号10の残基45にアスパラギン酸；配列番号10の残基45にアラニン；配列番号10の残基46にアラニン；配列番号10の残基47にアラニン；配列番号10の残基48にイソロイシン；配列番号10の残基48にアラニン；配列番号10の残基49にアラニン；配列番号10の残基49にセリン；配列番号10の残基51にフェニルアラニン；配列番号10の残基51にアスパラギン；配列番号10の残基52にアラニン；配列番号10の残基59にアスパラギン；配列番号10の残基62にトレオニン；配列番号10の残基67にセリン；配列番号10の残基70にアラニン；配列番号10の残基96にアルギニン；配列番号10の残基97にアラニン；配列番号10の残基100にアルギニン；配列番号10の残基100にグルタミン酸；配列番号10の残

20

30

40

50

基100にアラニン；配列番号10の残基100にトレオニン；配列番号10の残基101にアラニン；配列番号10の残基101にイソロイシン；配列番号10の残基102にアラニン；配列番号10の残基103にアラニン；配列番号10の残基103にグルタミン酸；配列番号10の残基104にアラニン；配列番号10の残基104にイソロイシン；配列番号10の残基105にアラニン；配列番号10の残基106にアラニン；配列番号10の残基106にイソロイシン；配列番号10の残基107にアラニン；配列番号10の残基107にロイシン；配列番号10の残基108にリシン；配列番号10の残基108にアラニン；配列番号10の残基108にセリン；配列番号10の残基116にアラニン；配列番号10の残基126にアラニン；配列番号10の残基132にアラニン；配列番号10の残基133にアラニン；配列番号10の残基134にアラニン；配列番号10の残基140にアラニン；配列番号10の残基142にイソロイシン；配列番号10の残基143にアラニン；配列番号10の残基146にアラニン；配列番号10の残基147にリシン；配列番号10の残基147にアラニン；配列番号10の残基148にチロシン；配列番号10の残基148にアラニン；配列番号10の残基149にアラニン；配列番号10の残基150にアラニン；配列番号10の残基150にグルタミン酸；配列番号10の残基151にアラニン；配列番号10の残基152にアラニン；配列番号10の残基152にトリプトファン；配列番号10の残基153にアラニン；配列番号10の残基154にアラニン；配列番号10の残基155にアラニン；配列番号10の残基158にアラニン；配列番号10の残基160にセリン；配列番号10の残基161にアラニン；または配列番号10の残基162にアラニン。

【0115】

本発明の核酸分子にはさらに、上記のエリスロポエチン突然変異タンパク質の1つに対して少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはより高いアミノ酸配列同一性を有する組換え型エリスロポエチン突然変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれる。2つのアミノ酸配列または2つのエリスロポエチン突然変異タンパク質をコードする核酸の同一性パーセントを決定するためには、それらの配列の最適な比較のためのアライメントを行う（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアライメントのために第1のアミノ酸または核酸配列にギャップを導入することができる）。その後、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を比較する。第1の配列の位置が第2の配列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ている場合には、これらの分子はその位置で同一となる。2つの配列間の同一性パーセントは、それらの配列によって共有される同一位置の数の関数である（すなわち、同一性% = 重なり合う同一位置の数 / 重なり合う位置の総数 × 100%）。一実施形態においては、2つの配列が同じ長さである。

【0116】

本発明の核酸分子にはさらに、上記の置換、欠失または修飾の1以上により改変されたエリスロポエチンコード化核酸配列が、配列番号7に対して少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または98%の配列同一性を有する、組換え型エリスロポエチン突然変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれる。本発明の核酸分子にはさらに、上記の置換、欠失または修飾の1以上により改変されたエリスロポエチンコード化核酸配列が非ヒト・エリスロポエチンをコードする核酸である、組換え型エリスロポエチン突然変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列が含まれる。

【0117】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は数学的アルゴリズムを使って行うこともできる。2つの配列を比較するために利用される数学的アルゴリズムの好適な例としては、限定するものではないが、KarlinおよびAltschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268に記載のアルゴリズムを、KarlinおよびAltschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877に記載のように改変したアルゴリズムがある。かかるアルゴリズムは、Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410に記載のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。NBLASTプログラムでスコア = 100、ワード長 = 12を用いてBLASTヌクレオチド検索を行うと、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列が得られる。

XBLASTプログラムでスコア = 50、ワード長 = 3を用いてBLASTタンパク質検索を行うと、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列が得られる。比較のためにギャップを入れたアライメントを得るためには、Altschulら, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402に記載されるようなGapped BLASTを利用することができる。あるいはまた、分子間の遠い関係を検出する反復検索を行うためには、PSI-Blastを使用することができる(Altschulら, 1997, 前掲)。BLAST、Gapped BLAST、およびPSI-Blastプログラムを利用する際には、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメーターを使用してもよい(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)。配列比較のために利用しうる数学的アルゴリズムのもう一つの好適な非限定的な例は、MyersおよびMiller, 1988, *CABIOS* 4:11-17に記載されるアルゴリズムである。この種のアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列の比較のためにALIGNプログラムを利用する際には、PAM120加重残基表(weight residue table)、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を用いることができる。

10

【0118】

2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを入れられるまたは入れられない、上記の方法と類似した方法を用いて決定することができる。同一性パーセントの計算では、一般的に、完全に一致したものだけを数える。

【0119】

本発明の核酸分子にはさらに、以下のものが含まれる:(a)上記の本発明のエリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインをコードする核酸分子に、ストリンジェント条件下(例えば、フィルターに結合させたDNAに約45 で6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でハイブリダイズさせ、続いて約50~65 で0.2x SSC/0.1% SDS中で1回以上洗浄する)、または(b)高度なストリンジェント条件下(例えば、フィルターに結合させたDNAに約45 で6x SSC中でハイブリダイズさせ、続いて約68 で0.1x SSC/0.2% SDS中で1回以上洗浄する)、あるいは当業者には明らかな他のハイブリダイゼーション条件下(例えば、Ausubel F.M.ら編, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., および John Wiley & sons, Inc., New York, pp. 6.3.1-6.3.6 および 2.10.3参照)でハイブリダイズするヌクレオチド配列。好ましくは、上記の(a)および(b)に記載の条件下でハイブリダイズするエリスロポエチン突然変異タンパク質をコードする核酸分子は、エリスロポエチン突然変異タンパク質をコードする核酸分子の相補体を含むものである。好ましい実施形態において、上記の(a)および(b)に記載の条件下でハイブリダイズする核酸分子は、エリスロポエチン突然変異タンパク質と機能的に同等な(すなわち、上記のエリスロポエチンの活性を1つ以上有する)タンパク質産物をコードする。好ましくは、本発明の核酸はヒトのものである。

20

30

【0120】

本発明の核酸分子にはさらに、上記のエリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインとハイブリダイズし、かつヘマトクリットの上昇、血管活性作用(血管収縮/血管拡張)、血小板の高活性化、血液凝固活性、および栓球産生の増加からなる群より選択される少なくとも1つの赤血球産生作用を欠失しているかまたは前記活性の低下を示す上記ヌクレオチド配列が含まれる。ここで、前記サイトカインまたは突然変異タンパク質は、哺乳動物の応答性細胞、組織または器官の機能または生存能の保護、維持、増強または回復からなる群より選択される少なくとも1つの応答性細胞保護活性を有するものである。前記低下は赤血球産生作用の1つのわずかな減少であってもよいし、欠失に近いものであってもよい。このような低下は当技術分野で公知の標準方法により測定することができる(Gruberら, 2002, *J. Biol Chem.* 277(81):27581-27584; Pageら, 1996, *Cytokine* 8(1):66-69; Parkら, 1997, *Mol. Cells* 7(6):699-704; Wolfら, 1997, *Thromb Haemost* 78:1505-1509; および Daleら, 2002, *Nature* 415:175-179)。第6.17節に記載するUT-7細胞アッセイは、赤血球産生作用の低下または減少を測定する方法の非限定

40

50

的な一例である。

【0121】

本発明の核酸分子には、上記の核酸の相補体も含まれる。

【0122】

エリスロポエチン突然変異タンパク質核酸分子の断片は、長さが少なくとも10、12、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1050個またはそれ以上連続したヌクレオチドでありうる上記のエリスロポエチン突然変異タンパク質核酸配列をさす。あるいはまた、前記断片はエリスロポエチン突然変異タンパク質の少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80またはそれ以上連続したアミノ酸残基をコードする配列を含むことができる。一実施形態において、エリスロポエチン突然変異タンパク質核酸分子は、対応するエリスロポエチン突然変異タンパク質の少なくとも1つの生物学的活性を示す遺伝子産物をコードする。エリスロポエチン突然変異タンパク質核酸分子の断片はまた、成熟エリスロポエチン突然変異タンパク質のドメインをコードするエリスロポエチン突然変異タンパク質コード領域の部分の部分をさすこともある。

10

【0123】

本発明のエリスロポエチン突然変異タンパク質を得るために、他の生物に由来するエリスロポエチンを使用することができる。エリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインの核酸の変異体ならびに他の生物種由来のホモログおよびオルソログのクローニングに関しては、本明細書に記載の単離されたエリスロポエチン核酸配列を標識して、対象の生物に由来する適切な細胞または組織から得られたmRNAより構築したcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用することができる。用いるハイブリダイゼーション条件は、一般に、cDNAライブラリーが標識した配列の起源生物の種類と異なる生物から誘導される場合には、より低いストリンジェント条件とすべきであり、例えば標的生物と基準生物との近縁関係に基づいて、容易に決定することができる。

20

【0124】

あるいはまた、対象の生物から誘導されたゲノムライブラリーを、この場合にも適切なストリンジェント条件を用いてスクリーニングするために、標識した断片を使用することができる。適切なストリンジェント条件は、上述したように当業者には周知であり、ライブラリーと標識配列の起源となる特定の生物に応じて変化するが、予測することが可能である。かかる条件に関するガイドラインとして、例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; および Ausubelら、1989-1999、Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates および Wiley Interscience, N.Y.を参照されたい(両文献とも、その全体を参照により本明細書に含めるものとする)。

30

【0125】

好ましい実施形態においては、組換え型組織保護サイトカインDNAを作製するために、関係するまたは相同な組換え型組織保護サイトカインの既知配列からデザインされたプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅によりゲノムまたはcDNA(すなわち、配列番号7)からDNAを増幅することができる。PCRは、選択に先立って、DNAクローンまたはゲノムもしくはcDNAライブラリー中の目的配列を増幅するために用いられる。PCRは例えばサーマルサイクラーおよびTaqポリメラーゼ(Gene Amp(登録商標))を用いて実施することができる。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は通常、目的の遺伝子または遺伝子断片を取得するために用いられる。例えば、所望の長さの組換え型組織保護サイトカインをコードするヌクレオチド配列は、オープンリーディングフレームをコードするヌクレオチド配列に隣接するPCRプライマーを用いて作製することができる。これとは別に、制限部位が利用可能である場合は、そのような制限エンドヌクレアーゼを用いて適切な部位で組換え型組織保護サイトカイン遺伝子配列を切断することにより、組換え型組織保護サイトカイン遺伝子をコードするDNAの断片が放出される。都合のよい制限部位が利用できない場合は、当技術分野で公知の部位特異的突然変異誘発および/またはDNA増幅法により制限部位を適切な位置に作製することができる(例えば、Shankarappaら、1992、PCR Method Appl

40

50

. 1: 277-278を参照されたい)。その後、組換え型組織保護サイトカインをコードするDNA断片を単離し、適正な翻訳リーディングフレームが確実に維持されるように注意を払いながら、適切な発現ベクターに連結させる。

【0126】

当技術分野で公知の突然変異誘発技術はすべて、発現されるペプチド配列のアミノ酸置換を行う目的で、または、さらなる操作を容易にする制限部位を作製/欠失する目的で、DNA配列中の個々のヌクレオチドを改変するために使用することができる。そのような技術としては、限定するものではないが、化学的突然変異誘発、*in vitro*部位特異的突然変異誘発(Hutchinsonら, 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551)、第6.3節に記載されるような特定オリゴヌクレオチドによる突然変異誘発(Smith, 1985, Ann. Rev. Genet. 19: 423-463; Hillら, 1987, Methods Enzymol. 155: 558-568)、PCRに基づくオーバーラップ伸長法(Hoら, 1989, Gene 77: 51-59)、PCRに基づくメガプライマー突然変異誘発(Sarkarら, 1990, Biotechniques 8: 404-407)などが挙げられる。改変は例えば二本鎖ジデオキシヌクレオチドDNA配列解析により確認することができる。

【0127】

本発明はまた、前の段落に記載したヌクレオチド配列の相補体である核酸分子(好ましくは、DNA分子)を包含する。

【0128】

特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、異種(例えば、ベクター、発現ベクター、または融合タンパク質)配列を含むまたはコードする核酸配列を含む核酸分子の一部として存在する。

【0129】

5.2. 本発明の組換え型組織保護サイトカイン

本発明の組換え型組織保護サイトカインには、部分的なまたは完全な赤血球産生作用を維持するエリスロポエチン突然変異タンパク質が含まれる。エリスロポエチンは、ヒトにおいて約34kDaの分子量を有する糖タンパク質のホルモンである。成熟タンパク質は165個のアミノ酸を含み、グリコシル残基はこの分子の重量の約40%を占める。本発明の実施において有用な組換え型組織保護サイトカインの形態は、天然形態、合形成態、および組換え形態の以下に挙げるヒトおよび他の哺乳動物のエリスロポエチン関連分子中に少なくとも1つのアミノ酸の改変を包含する: エリスロポエチン、アジアロエリスロポエチン、脱グリコシル化エリスロポエチン、エリスロポエチン類似体、エリスロポエチン模擬体、エリスロポエチン断片、ハイブリッドエリスロポエチン分子、エリスロポエチン受容体結合分子、エリスロポエチンアゴニスト、腎性エリスロポエチン、脳性エリスロポエチン、そのオリゴマーおよび多量体、ならびにその同属種。このような同等な組換え型組織保護サイトカインには、置換、欠失(内部欠失を含む)、付加(融合タンパク質を生じさせる付加を含む)、またはアミノ酸配列の中および/またはそれに隣接するアミノ酸残基の保存的置換を含みうる突然変異型エリスロポエチンが挙げられる。かかる変更は、機能的に同等なエリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインを生じるという点で「サイレント」変化をもたらす。好ましい実施形態では、組換え型組織保護サイトカインは非赤血球産生性であり、すなわち、赤血球産生作用を欠失しているか、または前記活性の低下を示す。保存的アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、および/または両親媒性における類似性に基づいて行うことができる。例えば非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられ、極性中性アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられ、正電荷をもつ(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、リシンおよびヒスチジンが挙げられ、そして負電荷をもつ(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。あるいは、非保存的アミノ酸変化、ならびに大きな挿入および欠失を用いて、機能的に改変された組換え型組織保護サイトカインを作製することができる。このような突然変異体を用いて、望み通りにエリスロポエチ

ン特性を変更することができる。例えば、一実施形態において、本発明の実施に有用なエリスロポエチンは、受容体結合に影響を及ぼすエリスロポエチンの4つの機能的ドメイン：VLQRY（配列番号1）および/またはTKVNFYAW（配列番号2）および/またはSGLRSLTTL（配列番号3）および/またはSNFLRG（配列番号4）の中の1個以上のアミノ酸が変化した組換え型組織保護サイトカインでありうる。他の実施形態においては、前記分子の動態または受容体結合特性に影響を及ぼす該分子の周辺領域に突然変異を含むエリスロポエチンを用いることができる。どの改変が、またはドメインのどの位置が結合に影響するかは、標準方法を用いて決定することができる。例えば、ドメインをpair-wiseアラニン突然変異（ala走査突然変異誘発）により改変し、続いて受容体結合に対する影響を調べるために突然変異体の結合動態を測定する（Bernatら，2003，PNAS 100:952-957；Wellsら，1989，Science 244:1081-1085）。

【0130】

「組換え型組織保護サイトカイン」という用語は、本発明の組換え型組織保護サイトカインおよびその更なる修飾体（例えば、組換え型組織保護サイトカインの脱グリコシル化形態、アシアリル化形態、他の部分的グリコシル化形態、またはアミノ酸の化学的修飾）を包含する。このような変異体の例は、限定するものではないが、Tsudaら，1990，Eur. J. Biochem. 188:405-411に記載されており、これを参照により本明細書に含めるものとする。サイトカインは非常に柔軟性であり、ヒト成長ホルモンの場合には柔軟性が活性化にとって必要であることが知られている（Wellsら，1989，Science 244:1081-1085）。したがって、エリスロポエチン受容体の正常な活性化を妨げるような、サイトカインの三次元構造を安定化する突然変異は本発明において意図される。さらに、組換え型組織保護サイトカインの発現および産生のために様々な宿主系を使用することができ、例えば、限定するものではないが、細菌、酵母、昆虫、植物、ヒトを含む哺乳動物の細胞系が挙げられる。例えば、産物のグリコシル化、アシアリル化、または部分的グリコシル化を行わない細菌により産生された組換え型組織保護サイトカインは、非グリコシル化形態の組換え型組織保護サイトカインを得るのに使用することができ、また、当技術分野で公知の方法（例えば、限定するものではないが、タンパク質のグリコシル化を調節するためのフコシル化の使用に関する米国特許出願番号：US 2003/0040037 A1およびUS 2003/0003529に開示された方法）を用いてさらにグリコシル化することもできる。あるいはまた、発現タンパク質をグリコシル化する能力がある他の系（例えば、植物、ヒト細胞を含む）で組換え型組織保護サイトカインを産生させてもよい。

【0131】

上記のように、本発明は、エリスロポエチンとの構造的関係の如何にかかわらず、応答性細胞に対してポジティブな活性を発揮する能力があるエリスロポエチン受容体活性調節分子をすべて包含する。

【0132】

さらに、組換え型組織保護サイトカインは、1つ以上の特定の組織に対してその活性を適応させるように修飾することができる。この望ましい組織特異性を達成するために行うことができる幾つかの非限定的なストラテジーとしては、循環半減期を短くして組換え型組織保護サイトカインが赤血球前駆体と相互作用しうる時間を少なくする修飾、またはエリスロポエチン突然変異タンパク質もしくは組換え型組織保護サイトカイン分子の一次構造の修飾が挙げられる。循環半減期を短くする1つのアプローチは、グリコシル化成分（エリスロポエチンは3つのN結合型と1つのO結合型を有する）を除去または修飾するものである。このようなグリコシル化組換え型組織保護サイトカインの変異体は、いくつかの方法で作製することができる。例えば、エリスロポエチンの一次構造を修飾して本発明の組織保護サイトカインを生成する方法は無数に存在し、例えば、1個以上の特定のアミノ酸の置換（すなわち、N結合型もしくはO結合型グリコシル化部位のアミノ酸を突然変異させることによる）、および/または1個以上のアミノ酸の化学的修飾、あるいはエリスロポエチンとその受容体との相互作用を妨げる他の構造の付加が含まれる。このような形態の組換え型組織保護サイトカインの使用は本発明に完全に包含される。糖鎖の末端に付いて

いるシアル酸は、シアル酸を糖鎖に結び付けている化学結合に応じて、特定のシアリダーゼによって除去することができる。あるいは、グリコシル化された構造は、特定の結合で切断する他の酵素を用いることによって様々な方法で取り除くことができる。好適な実施形態において、本発明の非エリスロポエチン性組換え型組織保護サイトカインの半減期は、天然エリスロポエチンの半減期から約90%だけ短縮される。

【0133】

これらの組換え型組織保護サイトカイン分子の幾つかは、それにもかかわらず、他の組織または器官においてエリスロポエチンそれ自体の作用を模倣する。例えば、天然エリスロポエチンの31位～47位のアミノ酸配列を含む17-merは、赤血球生成について不活性であるが、*in vitro*で神経細胞に対しては十分に活性である (Campana & O'Brien, 1998: *Int. J. Mol. Med.* 1:235-41)。

【0134】

さらに、本明細書中に記載する用途に望ましい組換え型組織保護サイトカイン誘導体分子は、グアニジン化、アミジン化、カルバミル化(カルバモイル化)、トリニトロフェニル化、アセチル化もしくはスクシニル化などのアシル化、ニトロ化、またはアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、チロシン、トリプトファンもしくはシステイン残基の修飾、あるいはカルボキシル基の修飾によって、特に例えば限定的なタンパク質加水分解、アミノ基の除去、および/または分子生物学的技法によるアルギニン、リシン、チロシン、トリプトファンもしくはシステイン残基の突然変異的置換によって作製することができる。これにより、特定の器官および組織に対して十分なレベルの活性を維持するが、他のもの(例えば、赤血球)に対しては活性をもたないエリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインが生成される(例えば、Satakeら; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1038: 125-9; その全体を参照により本明細書中に含めるものとする)。以下に記載するような1つの非限定的な例は、フェニルグリオキサールのようなグリオキサールとの反応によるエリスロポエチンのアルギニン残基の修飾である (Takahashi, 1977, *J. Biochem.* 81:395-402のプロトコールに従う)。以下に記載するように、このような組換え型組織保護サイトカイン分子はエリスロポエチンの神経栄養効果を完全に保持している。このような組換え型組織保護サイトカイン分子は、本明細書に記載する様々な用途および組成物のために完全に包含される。さらに、こうした化学的修飾はさらに、組換え型組織保護サイトカインの保護作用を増強するため、または天然エリスロポエチンのアミノ酸突然変異から生じる該分子の電荷の変化を中和するためにも使用される。かかる修飾は係属中の特許出願番号PCT/US01/49479(2001年12月28日出願)、第09/753,132号(2000年12月29日出願)、および代理人ファイル番号KW00-009C02-US(2002年7月3日出願)に記載されており、これらの全てを参照により本明細書に含めるものとする。

【0135】

合成および組換え分子、例えば脳エリスロポエチンおよび腎エリスロポエチン、組換え哺乳動物形態のエリスロポエチン、ならびにその天然の、腫瘍由来の、および組換えのアイソフォーム(例えば、組換え的に発現させた分子および相同的組換えにより調製されたもの)が本明細書中に提供される。さらに本発明は、エリスロポエチン受容体に結合するペプチドを含む分子、ならびにエリスロポエチンの構造的および/または生物学的特性の一部または全部を保有する組換え構築物または他の分子(エリスロポエチンの断片および多量体を含む)を包含する。グリコシル化部位の数が増加もしくは減少したエリスロポエチン突然変異タンパク質または他の組換え型組織保護サイトカインは本明細書中に含まれる。上記のように、「エリスロポエチン」および「模擬体」という用語は、本明細書中にあって、応答性細胞を保護および増強するエリスロポエチン関連分子および内皮細胞閉門を通過することができる分子を指すために、相互交換可能に用いられる。さらに、トランスジェニック動物によって産生される分子も本明細書中に包含される。本明細書中に包含されるエリスロポエチン分子は、本明細書中に記載するように、エリスロポエチン受容体と相互作用する能力、またはエリスロポエチン受容体活性を調節するもしくはエリスロポエチンにより活性化されたシグナル伝達カスケードを活性化する能力以外は、構造

10

20

30

40

50

的にまたは他の様式でエリスロポエチンに必ずしも似ている必要はないことに留意されたい。

【0136】

非限定的な例として、本発明の実施に有用な組換え型組織保護サイトカインの形態には以下のものが含まれる：米国特許第5,457,089号および米国特許第4,835,260号に記載されるカルボキシ末端のアミノ酸が改変されたもの；米国特許第5,856,298号に記載されるような、1分子あたり様々な数のシアル酸残基を有するエリスロポエチンアイソフォームおよびアシアロエリスロポエチン；米国特許第4,703,008号に記載されるポリペプチド；米国特許第5,767,078号に記載されるアゴニスト；米国特許第5,773,569号および第5,830,851号に記載されるエリスロポエチン受容体に結合するペプチド；米国特許第5,835,382号に

10

記載されるような、エリスロポエチン受容体を活性化する小分子模擬体；ならびにWO 9505465、WO 9718318、およびWO 9818926に記載されるエリスロポエチン類似体。上記引用文献の全ては、このような開示内容が、本発明の組換え型組織保護サイトカインの様々な代替形態またはこのような形態を調製する方法の参考となる程度に、本明細書中に組み込まれる。

【0137】

エリスロポエチンは、例えばPROCRIT (Ortho Biotech Inc., Raritan, NJ) およびEPOGEN (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA) という商標名で市販されている。

【0138】

エリスロポエチン (EPO) およびエリスロポエチン様分子の活性 (単位: unit) は、伝統的には、げっ歯類モデルにおいて (およびエリスロポエチンの国際標準品によって誘導される) 赤血球産生を刺激するその効力に基づいて定義される。通常のエリスロポエチン (分子量およそ30,000~34,000) の1 unit (U) は、タンパク質約8ngである (タンパク質1mgはおよそ125,000 Uである)。しかし、赤血球産生に対する効果は、本明細書においては所望の活性に付随するものであり、本発明の組換え型組織保護サイトカインの幾つかについての検出可能な特性である必要もないため、赤血球産生に基づく活性の定義は適切でない。したがって、本明細書中で用いてエリスロポエチンまたはエリスロポエチン関連分子の活性単位は、神経または他の応答性細胞系においてWHO国際標準エリスロポエチンにより誘発される活性と同じ活性を同じ細胞系で誘発するのに必要なタンパク質の量として定義される。当業者であれば、本明細書中に示されるガイダンスに従って、非赤血球産生性組換え型組織保護サイトカインまたは関連分子の単位を簡単に決定することができるであろう。

20

30

【0139】

組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質は、6.3項に記載されたエリスロポエチン核酸配列によってコードされるそれらのタンパク質およびポリペプチドを含むが、それらに限定されない。本発明は6.3項に記載されたエリスロポエチン遺伝子産物と機能的に同等な突然変異タンパク質を含む。このようなエリスロポエチン遺伝子産物は、エリスロポエチン核酸配列によってコードされるアミノ酸配列内でエリスロポエチンアミノ酸残基の1つ以上の欠失、付加または置換を含みうるが、それは結果としてサイレント変化を生じ、従って機能的に同等なエリスロポエチン遺伝子産物を産生しうる。アミノ酸置換は、関連する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性の類似性に基づいて行われうる。

40

【0140】

本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質は、例えば個別の点突然変異またはトランケーションなどの突然変異誘発によって生成され得る。本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質は、天然型の生物学的細胞保護活性を保持しているが、天然型のタンパク質の赤血球産生作用のうち1つ以上を欠失している。従って、限定された機能の突然変異タンパク質の添加によって、特定の生物学的効果を誘導することができる。

【0141】

50

組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質の構造の改変は、効力、安定性、または（例えば、突然変異タンパク質のリン酸化パターンを改変する）翻訳後修飾を向上させるような目的であり得る。このような改変した組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質は、天然型のタンパク質の細胞保護活性のうち少なくとも1つを保持するように設計された場合、またはその特異的なアンタゴニストを生じるように設計された場合、組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質の機能的同等物と考えられる。このような改変した組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質は、例えば、アミノ酸置換、欠失、または付加によって作製できる。

【0142】

例えば、ロイシンのイソロイシもしくはバリンによる単一置換、アスパラギン酸のグルタミン酸による単一置換、トレオニンのセリンによる単一置換、または構造的に関連したアミノ酸によるアミノ酸の同様な置換（すなわち、立体構造および/または荷電の等しい突然変異）が、結果として生じる分子の生物学的活性に大きな影響を与えないであろうと予測することは妥当である。

【0143】

組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質のアミノ酸配列の変化が、結果として機能的なホモログを生じるか、または非機能的なホモログ（すなわち非変異型サイトカインの活性のうち1つ以上を欠失している）を生じるかは、野生型サイトカインと同様の方法で細胞の応答を引き起こす、またはこのような応答を競合的に阻害する、改変型突然変異タンパク質の能力を評価することによって、容易に決定できる。2以上の置換が起こった組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質は、同様の方法で容易に試験できる。

【0144】

改変された機能を示す本発明の突然変異タンパク質は、望ましい活性またはその欠如について、本発明の組換え型組織保護サイトカインの突然変異体、例えばトランケート型突然変異体をコンビナトリアルライブラリーからスクリーニングすることによって同定できる。ある実施形態では、変異体の多様なライブラリーは核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発によって作製され、多様な遺伝子ライブラリーによってコードされる。変異体の多様なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を核酸配列に酵素的にライゲーションすることによって作製でき、縮重したセットの潜在的なタンパク質配列は、個々のポリペプチドとして、あるいは（例えばファージディスプレイのために）より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能となる。縮重オリゴヌクレオチド配列から本発明の組換え型組織保護サイトカインの潜在的な変異型のライブラリーを作製するために使用できる様々な方法がある。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当技術分野において公知である（例えば Narang, 1983, Tetrahedron 39:3; Itakuraら、1984, Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら、1984, Science 198: 1056; Ikeら、1983, Nucleic Acid Res. 11:477を参照）。

【0145】

更に、本発明の組換え型組織保護サイトカインのコード配列断片のライブラリーは、突然変異タンパク質のスクリーニングおよびそれに続く選択のための組換え型組織保護サイトカインの多様な集団を作製するために使用され得る。例えば、コード配列断片のライブラリーは、対象のコード配列の二本鎖PCR断片を、ニックングが1分子あたり約1回しか起こらない条件下でヌクレアーゼによって処理し、二本鎖DNAを変性させ、DNAを再生させて異なるニック導入産物由来のセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成し、S1ヌクレアーゼで処理することにより再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、結果として生じた断片ライブラリーを発現ベクターにライゲーションすることによって、作製され得る。この方法によって、対象の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質の様々なサイズのN末端および内部の断片をコードする発現ライブラリーが誘導され得る。

【0146】

点突然変異またはトランケーションによって作製されたコンビナトリアルライブラリー

10

20

30

40

50

の遺伝子産物をスクリーニングするため、ならびに、選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするための、いくつかの技術が当技術分野において知られている。膨大な遺伝子ライブラリーのスクリーニングのために、ハイスループット解析ができる最も広範に使用されている技術は、一般的に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、その結果生じるベクターライブラリーによって適切な細胞を形質転換すること、および、所望の活性の検出が、遺伝子(その産物が検出される)をコードしているベクターの単離を容易にする条件下においてコンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。Recursive ensemble mutagenesis (REM) という、ライブラリー中の機能的な突然変異体の頻度を向上させる技術は、本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質を同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用することができる (ArkinおよびYourvan, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgraveら、1993, Protein Engineering 6 (3):327-331)。

10

【0147】

突然変異タンパク質をコードしている単離された核酸分子は、コードされる組換え型組織保護サイトカインに1以上のアミノ酸置換、付加または欠失が導入されるように、エリスロポエチンヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することによって作製できる。突然変異は、部位特異的突然変異誘発およびPCRを介した突然変異誘発などの、標準的な技術によって導入できる。簡潔には、変化させるべきアミノ酸のトリヌクレオチドコドンとそれを置換するように、PCRプライマーを設計する。このプライマーを対象の組換え型組織保護サイトカインをコードしているDNAのPCR増幅に使用する。その後この断片を単離し、対象の組織保護サイトカインをコードしている完全長cDNAに挿入し、組換え技術により発現させる。結果として生じた組換え型組織保護サイトカインは今やアミノ酸置換を含んでいる。

20

【0148】

保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換は1個以上のアミノ酸残基において行われ得る。保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換の両方を行ってもよい。保存的置換は、それらの側鎖が関連しているアミノ酸のファミリー内で起こるものである。遺伝学的にコードされるアミノ酸は4つのファミリー、すなわち、(1)酸性アミノ酸=アスパラギン酸、グルタミン酸、(2)塩基性アミノ酸=リシン、アルギニン、ヒスチジン、(3)非極性アミノ酸=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、および(4)極性非荷電アミノ酸=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンに分類できる。同様に、アミノ酸レパートリーは(1)酸性アミノ酸=アスパラギン酸、グルタミン酸、(2)塩基性アミノ酸=リシン、アルギニン、ヒスチジン、(3)脂肪族アミノ酸=グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、ここでセリンおよびトレオニンは場合により脂肪族ヒドロキシアミノ酸として別に分類されてもよい、(4)芳香族アミノ酸=フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、(5)アミドアミノ酸=アスパラギン、グルタミン、ならびに(6)含硫アミノ酸=システインおよびメチオニンとして分類され得る(例えば、Biochemistry, 第4版、L. Stryer編、HW Freeman and Co.: 1995を参照)。

30

40

【0149】

あるいはまた、突然変異は、飽和突然変異誘発などによって、組換え型組織保護サイトカインのコード配列の全体または一部に沿って無作為に導入でき、結果として生じる突然変異体は活性を保持する突然変異体を同定するために生物学的活性についてスクリーニングされ得る。突然変異誘発に続いて、コードしたタンパク質を組換え技術により発現させることができ、組換え型組織保護サイトカインの活性が測定され得る。

【0150】

本明細書において有用な上述のエリスロポエチンの改変に加えて、以下の議論は本発明の様々な組換え型組織保護サイトカインに拡大する。上述のElliottらおよびWenらに記載

50

されるように、以下のエリスロポエチン突然変異タンパク質は、本明細書に記載する目的のために有用であり、本明細書に記載する方法のための医薬組成物に提供されうる。本明細書を通じて用いられる突然変異タンパク質の命名法では、変化したアミノ酸は、最初に天然のアミノ酸の一文字表記、続いてエリスロポエチン分子中でのその位置、続いて置換アミノ酸の一文字表記で表される。例えば、「ヒト・エリスロポエチンS100E」または「組換え型組織保護サイトカインS100E」は、アミノ酸100においてセリンがグルタミン酸に変化したヒト・エリスロポエチン分子を指す。本発明の実施に有用なこのような突然変異タンパク質は、少なくとも1個の以下のアミノ酸変化を有するヒト・エリスロポエチンを含むが、それらに限定されない。すなわち、

I6A, C7A, C7S,

R10I, V11S, L12A, E13A, R14A, R14E, R14Q, Y15A, Y15F, Y15I,
K20E, K20A,

E21A,

N24K, C29S, C29Y, A30N, H32T,

C33S, C33Y, N38K, N83K,

P42N,

P42A, D43A, T44I, K45D, K45A, V46A, N47A, F48I, F48A, Y49A, Y49S, 44-49欠失、

W51F, W51N, K52A,

Q59N,

E62T,

L67S,

L70A,

D96R, K97A

S100R, S100E, S100A, S100T, G101A, G101I, L102A, R103A, R103E, S104A, S104I,

L105A, T106A, T106I, T107A, T107L, L108K, L108A, L108S,

K116A,

S126A,

T132A,

I133A, T134A,

K140A,

F142I,

R143A,

S146A, N147K, N147A, F148Y, P148A, L149A, R150A, R150E, G151A,

K152A, K152W,

L153A,

K154A,

L155A, G158A,

C160S, C161A, またはR162Aである。

【 0 1 5 1 】

好ましい実施形態では、本発明のエリスロポエチン突然変異タンパク質または組換え型組織保護サイトカインは、1個以上の上記の置換を含む。他の実施形態では、本発明のエリスロポエチン突然変異タンパク質または別の組換え型組織保護サイトカインは、1つの上記の置換またはその組合せを含む。

【 0 1 5 2 】

代替的な実施形態では、本発明の組換え型組織保護サイトカイン、医薬組成物、使用および治療方法は、1個以上の以下の置換、すなわち、I6A, C7A, K20A, P42A, D43A, K45D, K45A, F48A, Y49A, K52A, K49A, S100E, R103A, K116A, T132A, I133A, K140A, N147K, N147A, R150A, R150E, G151A, K152A, K154A, G158A, C161A, またはR162Aを含まないという条件で、1個以上の上記の置換を含む。本発明の関連した実施形態では、本発明の組換え型組織保護サイトカイン、医薬組成物、使用および治療方法は、以下の置換の組合せ

10

20

30

40

50

のいずれか、すなわち、N24K/N38K/N83KまたはA30N/H32Tを含まないという条件で、1個以上の上記の置換を含む。

【0153】

特定の実施形態では、突然変異タンパク質を作製するために2個以上の上記のアミノ酸変化が組み合わされ得る。このような組合せの例は、K45D/S100E, A30N/H32T, K45D/R150E, R103E/L108S, K140A/K52A, K140A/K52A/K45A, K97A/K152A, K97A/K152A/K45A, K97A/K152A/K45A/K52A, K97A/K152A/K45A/K52A/K140A, K97A/K152A/K45A/K52A/K140A/K154A, N24K/N38K/N83K, およびN24K/Y15Aを含むが、それらに限定されない。特定の実施形態では、本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質は1個以上の上記の多重置換を含まない。特定の実施形態では、本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質を含有する本発明の医薬組成物は、1個以上の上記の多重置換を含まない。特定の実施形態では、本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質を利用する本発明の使用および治療方法は、1個以上の上記の多重置換を含まない。

10

【0154】

特定の改変または改変の組合せは、エリスロポエチン突然変異タンパク質の柔軟性に影響を及ぼすことができ、エリスロポエチン受容体またはエリスロポエチンもしくはエリスロポエチン突然変異タンパク質が結合する第二の受容体などの、受容体への結合に影響を及ぼす。本発明の組成物および方法に有用なこのような改変またはその組合せの例は、K152W, R14A/Y15A, I6A, C7A, D43A, P42A, F48A, Y49A, T132A, I133A, T134A, N147A, P148A, R150A, G151A, G158A, C161A, およびR162Aを含むが、それらに限定されない。対応する突然変異はヒト成長ホルモンでは有害であることが知られている(Wellsら)。特定の実施形態では、本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質は1個以上の上記の置換を含まない。特定の実施形態では、本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質を含有する本発明の医薬組成物は、1個以上の上記の置換を含まない。特定の実施形態では、本発明の組換え型組織保護サイトカイン突然変異タンパク質を利用する本発明の使用および治療方法は、1個以上の上記の置換を含まない。

20

【0155】

上記アミノ酸の改変に加えて、本発明の組換え型組織保護サイトカインは、少なくともシアル酸成分をもたない(アシアロエリスロポエチン突然変異タンパク質と呼ばれる)ものであってもよい。好ましくは、本発明のアシアロエリスロポエチン突然変異タンパク質は、ヒト・アシアロエリスロポエチンである。他の実施形態において、本発明の組換え型組織保護サイトカインは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または13個のシアル酸残基を有するものであってもよい。これは、組換え型組織保護サイトカインをシアリダーゼで、例えばProZyme Inc. (San Leandro, California)製のシアリダーゼAに関する製造業者のパッケージングに記載されるように、脱シアリル化することによって調製することができる。典型的には、PROZYME(登録商標)GLYCOPRO(登録商標)配列解析グレードのシアリダーゼA(商標)(N-アセチルノイラミン酸グリコヒドロラーゼ、EC 3.2.1.18)を用いて、複合炭水化物および糖タンパク質(例えば、エリスロポエチン)から全ての非還元末端シアル酸残基を切断する。これは(内部残基に結合した)分岐シアル酸をも切断する。シアリダーゼAは、アルトロバクター・ウレアファシエンス(Arthrobacter ureafaciens)のクローンから単離される。

30

40

【0156】

グリコペプチドのシアリル化の非限定的な例は、米国特許出願第US 2003/0040037号に記載されており、これは哺乳動物または細菌のシアリルトランスフェラーゼを用いてシアリル化する方法を開示している。シアリル化方法および糖タンパク質のシアリル化パターンの改変についての別の非限定的な例は、米国特許出願第US 2002/0160460 A1号および米国特許第6,399,336 B1号に見出せる。そこには、組換え糖タンパク質をシアリル化するためのin vitro方法が開示されており、その場合にはシアル酸ドナー成分がガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンアクセプター成分を有する糖タンパク質と組み合わせられる。このような方法では、アクセプターおよびドナーと組み合わせられたシアリルトランスフ

50

エラーゼがシアル酸をサッカライドに結合させる。

【0157】

本発明の組換え型組織保護サイトカインは、少なくともN結合型糖鎖の数が減少したものでありうる。N結合型糖鎖を除去するためには、例えば、Hermentinら（1996, *Glycobiology* 6(2): 217-30）により記載された方法に従って、組換え型組織保護サイトカインをヒドラジンで処理する。上記のように、エリスロポエチンは3つのN結合型糖鎖成分をもつ。本発明は、2つもしくは1つのN結合型糖鎖を持つまたは1つも持たないエリスロポエチンを包含する。

【0158】

本発明の組換え型組織保護サイトカインは、該サイトカインを少なくとも1種のグリコシダーゼで処理することにより少なくとも糖鎖の含有量を低下させたものでありうる。例えば、ChenおよびEvangelista, 1998, *Electrophoresis* 19(15): 2639-44の手法に従ってもよい。さらに、O結合型糖鎖の除去は、Hokkeら, 1995, *Eur. J. Biochem.* 228(3):981-1008に記載される方法に従って行ってもよい。

【0159】

組換え型組織保護サイトカイン分子の糖鎖部分は、組換え型エリスロポエチン突然変異タンパク質を非哺乳動物細胞中で発現させることによって少なくとも非哺乳動物のグリコシル化パターンを有していてもよい。好ましくは、本発明の組換え型組織保護サイトカインは昆虫または植物細胞において発現される。非限定的な例として、バキュロウイルス発現系を用いた昆虫細胞内での組換え型組織保護サイトカインの発現は、Quelleら, 1989, *Blood* 74(2):652-657に従って行うことができる。他の方法は、米国特許第5,637,477号に記載されている。植物細胞系での発現は、Matsumotoら, 1993, *Biosci., Biotech. Biochem.* 57(8): 1249-1252の方法に従って行うことができる。あるいは、細菌内で発現させると、非グリコシル化形態の組換え型組織保護サイトカインが得られる。これらは単に、本発明の組換え型組織保護サイトカインの製造に有用な方法の例であり、限定的なものではない。

【0160】

グリコシル化パターンの改変方法の非限定的な例は、米国特許出願US 2003/0040037 A1および米国特許出願US 2003/0003529 A1に記載されるフコシル化を用いることである。そこには、グリコペプチドのグリコシル化パターンを改変する方法として、フコシルトランスフェラーゼのためのアクセプター成分を有するグリコペプチドを、フコースドナー成分を有する反応混合物と接触させることによりグリコペプチドのグリコシル化パターンを改変する方法が記載されている。また、組換えグリコペプチドを用いてグリコシル化パターンを改変する方法も開示されている。

【0161】

本発明の組換え型組織保護サイトカインは、少なくとも1つ以上の酸化された糖鎖（化学的に還元することもできる）を有するものであってよい。例えば、組換え型組織保護サイトカインは、過ヨウ素酸塩により酸化されたエリスロポエチン突然変異タンパク質であってもよい。この過ヨウ素酸塩により酸化されたエリスロポエチン突然変異タンパク質はまた、水素化ホウ素ナトリウムやシアノ水素化ホウ素ナトリウムなどのホウ水素化物で化学的に還元することができる。過ヨウ素酸塩によるエリスロポエチン突然変異タンパク質の酸化は、例えば、Linsleyら, 1994, *Anal. Biochem.* 219(2):207-17に記載された方法によって実施することができる。過ヨウ素酸塩による酸化の後の化学的還元は、TonilliおよびMeints, 1978, *J. Supramol. Struct.* 8(1):67-78の方法に従って実施することができる。

【0162】

天然エリスロポエチンに対する上記および下記のアミノ酸の修飾のいくつかは、天然分子の化学的修飾のための特定の標的アミノ酸が本発明の組換え型組織保護サイトカインを生成するためにすでに改変されているため、可能でないことがあることに留意すべきである。もちろん、改変されたアミノ酸それ自体を化学的修飾に供してもよく、本発明はその

ような分子をすべて包含する。当業者であれば、本発明の組換え型組織保護サイトカインの利用可能なアミノ酸残基およびそれに対して利用可能な修飾を容易に決定することができよう。

【0163】

上記用途のための組換え型組織保護サイトカインは、少なくとも1つ以上の修飾されたアルギニン残基をもつことができる。例えば、組換え型組織保護サイトカインは、1つ以上のアルギニン残基上にR-グリオキサル成分（ここで、Rはアリール、ヘテロアリール、低級アルキル、低級アルコキシもしくはシクロアルキル基、または -デオキシグリシトリアル基でありうる）を含むものであってよい。本明細書中で用いる低級「アルキル」という用語は、直鎖状もしくは分岐鎖状の飽和脂肪族炭化水素基（好ましくは1~6個の炭素原子を含むもの）を意味する。このような基の代表的なものとしては、メチル、エチル、イソプロピル、イソブチル、ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが挙げられる。「アルコキシ」という用語は、該分子の残りの部分に酸素によって結合された上記定義の低級アルキル基を意味する。アルコキシの例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシなどが挙げられる。「シクロアルキル」という用語は、3個~約8個の炭素を有する環状アルキル基（例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロヘキシルなどを含む）を指す。アリールという用語は、フェニル基およびナフチル基を指す。ヘテロアリールという用語は、酸素、窒素および硫黄からなる群より選択される1~3個のヘテロ原子を含む4~10員の複素環式基を指す。例としては、イソキサゾリル、フェニルイソキサゾリル、フリル、ピリミジニル、キノリル、テトラヒドロキノリル、ピリジル、イミダゾリル、ピロリジニル、1,2,4-トリアゾリル、チアゾリル、チエニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。R基は、例えば、3-デオキシグルコソンの2,3,4-トリヒドロキシブチル基として置換されていてもよい。R-グリオキサル化合物の典型的な例は、グリオキサル、メチルグリオキサル、3-デオキシグルコソン、およびフェニルグリオキサルである。好適なR-グリオキサル化合物は、メチルグリオキサルまたはフェニルグリオキサルである。このような修飾方法の例は、Werberら, 1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11); 1169-70 (フェニルグリオキサルを用いるもの)に記載されている。

10

20

【0164】

更なる例において、少なくとも1つのアルギニン残基は、2,3-ブタンジオンまたはシクロヘキサジオンなどのピシナルジケトンとの反応（好ましくは、約50mmolのホウ酸塩緩衝液（pH8~9）中での反応）により修飾することができる。2,3-ブタンジオンを用いた後者の修飾を行うための手法は、Riordan, 1973, *Biochemistry* 12(20):3915-3923に従って行うことができる。また、シクロヘキサノンを用いた手法は、Patthyら, 1975, *J. Biol. Chem* 250(2):565-9に従って行うことができる。

30

【0165】

本発明の組換え型組織保護サイトカインは、少なくとも1つ以上の修飾されたリシン残基を含むもの、もしくはエリスロポエチン分子のN末端アミノ基が修飾されたものであってもよく、このような修飾としては、リシン残基をアミノ基修飾剤と反応させて得られるものがある。他の実施形態において、リシン残基は、グリオキサル誘導体との反応（例えばグリオキサル、メチルグリオキサルまたは3-デオキシグルコソンとの反応）によって修飾し、-カルボキシアルキル誘導体を形成することができる。例としては、GlombおよびMonnier, 1995, *J. Biol. Chem.* 270(17): 10017-26に記載されるような、グリオキサルとの反応によりカルボキシメチルリシンを形成させるもの、または、Degenhardtら, 1998, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*44(7):1139-45に記載されるような、メチルグリオキサルとの反応により（1-カルボキシエチル）リシンを形成させるものが挙げられる。修飾されたリシン残基をさらに化学的に還元してもよい。例えば、リシン基を介して組換え型組織保護サイトカインをピオチン化してもよい。この場合には、D-ピオチノイル- -アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルをエリスロポエチンと反応させた後、セントリコン（Centricon）10カラムでのゲル濾過により未反応ピオチンを除去する（WojchowskiおよびCaslake, 1989, *Blood* 74(3):952-8に記載される）。上記

40

50

論文において、著者らは、エリスロポエチンをビオチン化するのに3つの異なる方法を使用しており、これらの方法はどれも、本明細書に記載する用途のためのエリスロポエチン類を調製するのに使用することができる。ビオチンは、(1)シアル酸成分、(2)カルボキシレート基、または(3)アミノ基に付加することができる。

【0166】

他の好適な実施形態では、リシンをアルデヒドまたは還元糖と反応させてイミンを形成させ、このイミンを、シアノ水素化ホウ素ナトリウム等を用いた還元により安定化させて、グルシトリルリシンのようなN-アルキル化リシンを形成してもよいし、または還元糖を用いる場合は、該イミンをアマドリ(Amadori)転移またはヘインズ(Heyns)転移により安定化させて、 α -デオキシ- β -フルクトシルリシンのような α -デオキシ- β -アミノ糖を形成してもよい。例として、リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中で0.5Mグルコースと共に60日間インキュベートすることによるフルクトシルリシン修飾型タンパク質の調製が、Makitaら, 1992, J. Biol. Chem. 267:5133-5138に記載されている。他の例として、リシン基は、シアネートイオンとの反応によってカルバミル化されてもよいし、アルキル-もしくはアリール-イソシアネート、またはアルキル-もしくはアリール-イソチオシアネートとの反応によって、アルキル-もしくはアリール-カルバミル化、または-チオカルバミル化されてもよい。あるいは、リシン基は、反応性のアルキル-もしくはアリール-カルボン酸誘導体との反応(例えば、無水酢酸、無水コハク酸、または無水フタル酸との反応)によりアシル化されてもよい。例としては、4-スルホフェニルイソチオシアネートまたは無水酢酸を用いたリシン基の修飾が挙げられる(これらはいずれも、Gaoら, 1994, Proc. Natl Acad Sci USA 91(25):12027-30に記載されている)。またリシン基は、トリニトロベンゼンスルホン酸または好ましくはその塩との反応によって、トリニトロフェニル修飾されてもよい。

10

20

【0167】

組換え型組織保護サイトカインの少なくとも1つのチロシン残基は、求電子試薬によって、例えばニトロ化またはヨウ素化によって、芳香環位置で修飾されてもよい。非限定的な例として、エリスロポエチンを、テトラニトロメタンと反応させたり(Nestlerら, 1985, J. Biol. Chem. 260(12):7316-21)、実施例4に記載するようにヨウ素化したりすることができる。

【0168】

組換え型組織保護サイトカインの少なくともアスパラギン酸またはグルタミン酸残基は、例えば、カルボジイミドとの反応を行った後にグリシンアミド(ただしこれに限定されない)のようなアミンとの反応により、修飾することができる。

30

【0169】

他の例においては、組換え型組織保護サイトカインのトリプトファン残基を、例えば、n-ブロモスクシンイミドまたはn-クロロスクシンイミドとの反応の後に、Josserら, Chem Biol Interact 1999 May 14;119-120に記載されるような方法を行うことによって、修飾することができる。

【0170】

さらに他の例において、組換え型組織保護サイトカインは、少なくとも1つのアミノ基を除去することによって調製することができ、これは、例えば、ニンヒドリンと反応させた後に、生じるカルボニル基をホウ水素化物との反応によって還元することにより達成することができる。

40

【0171】

さらに他の例において、エリスロポエチン分子中のシステイン結合のうちの少なくとも1つの開裂を少なくとも有する組換え型組織保護サイトカインを得るために、ジチオトレイトールのような還元剤と反応させた後に、生じるスルフヒドリルをヨードアセトアミド、ヨード酢酸または他の求電子試薬と反応させてジスルフィド結合の再形成を防止する。これとは別に、または組み合わせて、上述したように、ジスルフィド結合を破壊するには、実際の架橋に関与しているシステイン分子を、エリスロポエチン突然変異タンパク質が

50

天然分子中に存在するジスルフィド結合の少なくとも1つを形成できないようにする少なくとも1つの他のアミノ酸残基に改変する。

【0172】

組換え型組織保護サイトカインは、例えばトリプトファン残基の後で切断するために、特定の残基を標的とする限定的な化学的タンパク質加水分解にエリスロポエチンを供することにより、調製することができる。このようにして得られる組換え型組織保護サイトカイン断片は本明細書中に包含される。

【0173】

上記のように、本明細書中に記載した目的のために有用な組換え型組織保護サイトカインは、上記修飾のうち少なくとも1つを有するものでありうるが、上記修飾の2つ以上を有するものであってもよい。分子の糖鎖部分に1つの修飾とアミノ酸部分に1つの修飾とを有する組換え型組織保護サイトカインの例として、組換え型組織保護サイトカインはアシアロエリスロポエチンであって、その45位のリシン残基がアスパラギン酸に改変されたものであってもよい。

【0174】

かくして、種々の組換え型組織保護サイトカイン分子および本明細書中に記載する用途のためのこれらを含む医薬組成物が包含される。上記のように、かかるエリスロポエチン分子として、本明細書中の教示に基づいて幾つか代表的な例(ただし非限定的な例)を挙げると、アシアロエリスロポエチン、N-脱グリコシル化エリスロポエチン、O-脱グリコシル化エリスロポエチン、糖鎖の含有量が低下したエリスロポエチン、グリコシル化パターンが改変されたエリスロポエチン、酸化された後に還元された糖鎖を有するエリスロポエチン、アリアルグリオキサール修飾型エリスロポエチン、アルキルグリオキサール修飾型エリスロポエチン、2,3-ブタンジオン修飾型エリスロポエチン、シクロヘキサジオン修飾型エリスロポエチン、ピオチン化エリスロポエチン、N-アルキル化-リシル-エリスロポエチン、グルシトリルリシンエリスロポエチン、-デオキシ-フルクトシルリシン-エリスロポエチン、カルバミル化エリスロポエチン、アセチル化エリスロポエチン、スクシニル化エリスロポエチン、-カルボキシアルキルエリスロポエチン、ニトロ化エリスロポエチン、ヨウ素化エリスロポエチンである突然変異タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。好ましいのはヒト・エリスロポエチンに基づいた上記修飾形態である。

【0175】

さらに、本発明は、上記の組換え型組織保護サイトカイン、およびそのような化合物を含有する医薬組成物を包含する。非限定的な例として、このような組換え型組織保護サイトカインとしては、過ヨウ素酸塩酸化型エリスロポエチン突然変異タンパク質、グルシトリルリシンエリスロポエチン突然変異タンパク質、フルクトシルリシンエリスロポエチン突然変異タンパク質、3-デオキシグルコソンエリスロポエチン突然変異タンパク質、およびカルバミル化アシアロエリスロポエチン突然変異タンパク質が挙げられる。

【0176】

5.3. 発現系

様々な宿主-発現ベクター系を利用して、本発明のエリスロポエチン突然変異タンパク質分子を含めた、組換え型組織保護サイトカインを生産することができる。このような宿主-発現系は、ビヒクル(これにより目的の組換え型組織保護サイトカインが生産され、その後精製される)を表すが、細胞(適当なヌクレオチドコード配列で形質転換もしくはトランスフェクトされた場合に、*in situ*で修飾型エリスロポエチン遺伝子産物を示すことができる)をも表しうる。これらには、限定するものではないが、細菌、昆虫、植物、哺乳動物(ヒトを含む)の宿主系が含まれ、例えば、組換え型組織保護サイトカイン産物をコードする配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染させた昆虫細胞系;組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルスCaMV;タバコモザイクウイルスTMV)に感染させた植物細胞系、または組換え型組織保護サイトカインをコードする配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系;あるいは、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプ

10

20

30

40

50

ロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を保有している、ヒト細胞系を含む哺乳動物細胞系（例えば、HT1080、COS、CHO、BHK、293、3T3）。

【0177】

発現構築物は、本明細書で用いられる場合、適切な宿主細胞において組換え型組織保護サイトカインの発現を可能にする1つ以上の調節領域に機能的に連結された、組換え型組織保護サイトカインをコードするヌクレオチド配列を指す。「機能的に連結された」とは、調節領域と発現されるべき組換え型組織保護サイトカインポリペプチド配列が連結され、組換え型組織保護サイトカイン配列の転写および最終的には翻訳を可能にするように配置される結合を表す。様々な発現ベクターが組換え型組織保護サイトカインの発現のために使用され、プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド、または改変したウイルスを含むが、それらに限定されない。例は、ラムダ誘導体のようなバクテリオファージ、あるいはpBR322もしくはpUCプラスミド誘導体またはBluescriptベクター（Stratagene）などのプラスミドを含む。一般的に、このような発現ベクターは、適切な宿主細胞におけるベクターの増幅のための機能的な複製起点、組換え型組織保護サイトカイン遺伝子配列の挿入のための1つ以上の制限酵素部位、および1つ以上の選択マーカを含む。

10

【0178】

好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドをもとのヒトEPO cDNAクローンにアニーリングして、上述のような突然変異を導入するためにpCI-neoベクターを使用する。pCI-neoベクターはネオマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子という哺乳動物細胞での選択マーカを有する。pCI-neoベクターは、一過性の発現のために、または、抗生物質G-418を用いてトランスフェクト細胞を選択することによる安定した発現のために使用され得る（Brondyk, 1995, New Mammalian Expression Vector with a selectable marker: pCI-neo. Promega Notes 51, 10-14）。

20

【0179】

哺乳動物宿主細胞での組換え型組織保護サイトカインの発現のために、様々な調節領域、例えば、SV40初期プロモーターおよび後期プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーター、ならびにラウス肉腫ウイルス長末端反復（RSV-LTR）プロモーターが使用され得る。哺乳動物細胞において有用でありうる誘導性プロモーターは、メタロチオネインII遺伝子、マウス乳癌ウイルス・グルココルチコイド応答性長末端反復（MMTV-LTR）、および γ -インターフェロン遺伝子と結合しているものを含むが、それらに限定されない（Williamsら、1989, Cancer Res. 49: 2735-42; Taylorら、1990, Mol. Cell. Biol. 10: 165-75）。

30

【0180】

宿主細胞での組換え型組織保護サイトカインの発現の効率は、発現ベクター中に、SV40ウイルス、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、免疫グロブリン遺伝子、メタロチオネイン、 α -アクチンにおいて見いだされるもののような適切な転写エンハンサーエレメントを含めることによって増強されうる（Bittnerら、1987, Methods in Enzymol. 153: 516-544; Gorman, 1990, Curr. Op. In Biotechnol. 1: 36-47を参照）。

40

【0181】

発現ベクターはまた、2種類以上の宿主細胞においてベクターの維持および複製を可能にする配列、または宿主染色体内へのベクターの組込みを可能にする配列を含んでいてもよい。このような配列は、複製起点、自律複製配列（ARS）、セントロメアDNA、およびテロメアDNAを含むが、それらに限定されない。少なくとも2種類の宿主細胞において複製され維持され得るシャトルベクターの使用もまた、有利でありうる。

【0182】

更に、発現ベクターは、組換え型組織保護サイトカインをコードするDNAを有する宿主細胞を最初に単離もしくは同定するために、選択可能またはスクリーニング可能なマーカ遺伝子を含みうる。長期間、多収量の組換え型組織保護サイトカインの産生のために、

50

哺乳動物細胞、植物細胞、細菌細胞、または真菌細胞での安定した発現が使用され得る。多くの選択系が哺乳動物細胞のために使用され、それは、それぞれtk-、hgp^rt-またはap^rt-細胞で使用できる、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (Wiglerら、1977, Cell 11: 223)、ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (SzybalskiおよびSzybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48: 2026)、ならびにアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowryら、1980, Cell 22: 817) 遺伝子を含むが、それらに限定されない。代謝拮抗物質耐性もまた、メトトレキセートに耐性を与えるジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) (Wiglerら、1980, Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3567; O'Haraら、1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1527)、ミコフェノール酸に耐性を与えるgpt (MulliganおよびBerg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 2072)、アミノグリコシドG-418に耐性を与えるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (neo) (Colberre-Garapinら、1981, J. Mol. Biol. 150: 1)、およびハイグロマイシンに耐性を与えるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (hyg) (Santerreら、1984, Gene 30: 147) に対する選択の基礎として使用できる。限定はされないがヒスチジノールおよびゼオシン (商標) などの、他の選択可能なマーカーもまた使用できる。

10

20

30

40

50

【0183】

組換え型組織保護サイトカインのコード配列をベクターのクローニング部位に挿入するために、プロモーターなどの調節機能を有するDNA配列を該コード配列に結合させなければならない。これを行うために、適切な適合性の制限部位を提供するリンカーまたはアダプターが、組換え型組織保護サイトカインをコードするcDNAまたは合成DNAの末端に当技術分野において周知の技術によって (Wuら、1987, Methods Enzymol. 152: 343-349) ライゲーションされうる。制限酵素による切断に続いて、ライゲーションの前に一本鎖DNA末端の消化または埋め込みにより平滑末端を作る修飾が行われ得る。別法として、望ましい制限酵素部位は、望ましい制限酵素部位を含むプライマーを用いたPCRの使用によってDNAを増幅することにより、DNA断片に導入できる。

【0184】

調節領域と機能的に連結された組換え型組織保護サイトカインコード配列を含む発現構築物は、本発明の組換え型組織保護サイトカインの発現および産生のために更なるクローニングなしで適切な宿主細胞に直接導入できる (例えば、米国特許第5,580,859号を参照)。発現構築物はまた、例えば相同組換えによって、コード配列の宿主細胞ゲノム内への組込みを促進するDNA配列を含みうる。この場合、組換え型組織保護サイトカインを宿主細胞に伝播させ発現させるために、適切な宿主細胞に適した複製起点を有する発現ベクターを使用する必要はない。

【0185】

クローニングされた組換え型組織保護サイトカインのコード配列を含む発現構築物は、当技術分野において公知の様々な技術によって哺乳動物宿主細胞に導入でき、それはリン酸カルシウムを介したトランスフェクション (Wiglerら、1977, Cell 11:223-232)、リポソームを介したトランスフェクション (Schaefer-Ridderら、1982, Science 215:166-168)、エレクトロポレーション (Wolffら、1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:3344) およびマイクロインジェクション (Capechi, 1980, Cell 22: 479-488) を含むが、それらに限定されない。

【0186】

更に、挿入された配列の発現を調節する、または、遺伝子産物を望ましい特定の方法で修飾およびプロセシングする宿主細胞株もまた選択されうる。このようなタンパク質産物の修飾 (例えばグリコシル化) およびプロセシング (例えば切断) は、タンパク質の機能にとって重要でありうる。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾に対して特有の特異的なメカニズムを有する。発現される外来タンパク質の正しい修飾およびプロセシングを確実にするために、適切な細胞株または宿主系が選択される。このために、一次転写産物の適切なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞が使用されうる。ヒト宿主細胞

を含むこのような哺乳動物宿主細胞は、HT1080、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、およびWI38を含むが、それらに限定されない。

【0187】

長期間、多収量の組換えタンパク質の産生のためには、安定した発現が望ましい。例えば、組換え型組織保護サイトカイン関連分子遺伝子産物を安定に発現する細胞株が操作されうる。ウイルスの複製起点を持つ発現ベクターを使用するよりむしろ、宿主細胞は、適切な発現調節エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等）および選択マーカーによって制御されるDNAで形質転換され得る。外来DNAの導入に続いて、操作された細胞は1~2日間富化培地で増殖させることができ、その後、それらは選択培地に切り換えられる。組換えプラスミドの選択マーカーは、選択に対して耐性を与え、細胞がプラスミドをそれらの染色体内に安定に組み込んで増殖することを可能にし、クローニングおよび細胞株への増殖を可能にする増殖巣を形成する。この方法を有利に用いて、組換え型組織保護サイトカイン遺伝子産物を発現する細胞株を作製することができる。このような細胞株は、組換え型組織保護サイトカイン遺伝子産物の内在性活性に影響を及ぼす化合物のスクリーニングおよび評価において特に有用でありうる。

10

【0188】

本明細書に記載されるクローニングベクターおよび発現ベクターはいずれも、当技術分野において周知の技術によって既知のDNA配列から合成され、組み立てられる。調節領域およびエンハンサーエレメントは、様々な起源のものであってよく、天然および合成の両方であり得る。ベクターおよび宿主細胞のいくつかは、商業的に入手できる。有用なベクターの非限定的な例は、参照により本明細書に組み入れられるCurrent Protocols in Molecular Biology, 1988, Ausubelら編、Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscienceの付表5、ならびにClontech Laboratories、Stratagene Inc、およびInvitrogen, Incなどの販売供給元のカタログに記載されている。

20

【0189】

別法として、多数のウイルスに基づく発現系もまた、組織保護サイトカインの組換え発現のために哺乳動物細胞と共に利用されうる。DNAウイルス骨格を用いたベクターは、シミアンウイルス40 (SV40) (Hamerら、1979, Cell 17: 725)、アデノウイルス (Van Dor enら、1984, Mol. Cell Biol. 4: 1653)、アデノ随伴ウイルス (McLaughlinら、1988, J . Virol. 62: 1963)、およびウシ乳頭腫ウイルス (Zinnら、1982, Proc. Natl. Acad. S ci. 79:4897) に由来している。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、ドナーDNA配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御領域、例えば、後期プロモーターおよびトリパーティリーダー配列にライゲーションされうる。このキメラ遺伝子は、その後、in vitroまたはin vivoでの組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入されうる。ウイルスゲノムの非必須領域（例えばE1またはE3領域）への挿入は、生存能力があり、感染した宿主において異種産物を発現できる組換えウイルスを生じるであろう (LoganおよびShe nk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 81: 3655-3659を参照)。

30

【0190】

別法として、ワクシニア7.5Kプロモーターを使用してもよい (例えば、Mackettら、198 2, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 7415-7419; Mackettら、1984, J. Virol. 49:85 7-864; Panicaliら、1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 4927-4931を参照)。ヒト宿主細胞を用いる場合、エプスタイン-バーウイルス (EBV) 複製起点 (OriP) およびEB V核抗原1 (EBNA-1;トランス作用性複製因子) に基づくベクターが使用される。このよう なベクターは、多様な種類のヒト宿主細胞、例えば、EBO-pCD (Spickofskyら、1990, DNA Prot. Eng. Tech. 2: 14-18)、pDR2および DR2 (Clontech Laboratoriesから入手可能) に使用できる。

40

【0191】

組換え型組織保護サイトカインの発現はまた、レトロウイルスに基づく発現系によっても達成され得る。トランスフェクションとは異なり、レトロウイルスは、例えば一次造血

50

細胞を含む広範な種類の細胞に効率的に感染し、遺伝子を伝達することができる。モロニー Maus 白血病ウイルスのようなレトロウイルスでは、大部分のウイルス遺伝子配列が除去され、組換え型組織保護サイトカインコード配列と置換され得る一方、欠如したウイルス機能はトランスで供給され得る。レトロウイルスベクターによる感染の宿主範囲はまた、ベクターのパッケージングのために用いられるエンベロープの選択によって操作できる。

【0192】

例えば、レトロウイルスベクターは、5'長末端反復(LTR)、3'LTR、パッケージングシグナル、細菌での複製起源および選択マーカールを含み得る。組換え型組織保護サイトカインDNAは、5'LTRプロモーターからの転写がクローニングしたDNAを転写するように、5'LTRと3'LTRとの間の位置に挿入される。5'LTRはプロモーターを含み、LTRプロモーター、R領域、U5領域およびプライマー結合部位をその順番で含むが、それらに限定されない。これらのLTRエレメントのヌクレオチド配列は、当技術分野において周知である。異種プロモーターならびに多剤選択マーカールもまた、感染細胞の選択を容易にするために、発現ベクターに含まれる(McLauchlinら、1990, *Prog. Nucleic Acid Res. and Molec. Biol.* 38: 91-135; Morgensternら、1990, *Nucleic Acid Res.* 18: 3587-3596; Choulifaら、1996, *J. Virol* 70: 1792-1798; Boesenら、1994, *Biotherapy* 6: 291-302; SalmonsおよびGrunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4: 129-141;ならびにGrossmanおよびWilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3: 110-114を参照)。

【0193】

本発明のある実施形態では、シアル酸残基が不完全な、または、シアル酸残基を完全に欠如している組換え型組織保護サイトカインが、ヒト細胞を含む哺乳動物細胞において産生される。このような細胞は、シアル酸を付加する酵素、すなわち、 α -ガラクトシド 2,3シアルルトランスフェラーゼ(A α 2,3シアルルトランスフェラーゼ@)および α -ガラクトシド 2,6シアルルトランスフェラーゼ(A α 2,6シアルルトランスフェラーゼ@)活性に欠陥がある、または、欠失するように操作される。ある実施形態では、 α 2,3シアルルトランスフェラーゼ遺伝子と α 2,6シアルルトランスフェラーゼ遺伝子のいずれか、または、両方が欠失された哺乳動物細胞が用いられる。このような欠失は、当技術分野において周知の遺伝子ノックアウト技術を用いて構築することができる。別の実施形態では、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)欠損チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が、組換え型組織保護サイトカインの産生のための宿主細胞として用いられる。CHO細胞は、酵素 α 2,6シアルルトランスフェラーゼを発現せず、従って、これらの細胞で産生される糖タンパク質のN結合型オリゴ糖に2,6結合でシアル酸を付加しない。その結果、CHO細胞で産生される組換えタンパク質は、ガラクトースへの2,6結合でのシアル酸を欠如している(Sasakiら、1987; Takeuchiら、上述; Mutsaersら、*Eur. J. Biochem.* 156, 651 (1986); Takeuchiら、*J. Chromatogr.* 400, 207 (1987))。ある実施形態では、アシアロエリスロポエチン産生のための宿主細胞を作製するために、CHO細胞内の α 2,3シアルルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が欠失される。このような α 2,3シアルルトランスフェラーゼノックアウトCHO細胞は、完全にシアルルトランスフェラーゼ活性を欠如し、結果として、アシアロエリスロポエチン突然変異タンパク質の組換え発現および産生に有用である。

【0194】

別の実施形態では、アシアロ糖タンパク質は、ゴルジ装置内へのシアル酸輸送の妨害によって産生され得る(例えば、Eckhardtら、1998, *J. Biol. Chem.* 273:20189-95)。当業者にとって周知の方法(例えば、Oelmannら、2001, *J. Biol. Chem.* 276:26291-300)を用いた、ヌクレオチド糖CMP-シアル酸トランスポーターの突然変異誘発が、チャイニーズハムスター卵巣細胞の突然変異体を作製するために行われ得る。これらの細胞は、シアル酸残基を組換え型組織保護サイトカインのような糖タンパク質に付加することができず、アシアロエリスロポエチン突然変異タンパク質のみを産生できる。

【0195】

10

20

30

40

50

エリスロポエチン突然変異タンパク質を産生するトランスフェクト哺乳動物細胞はまた、細胞質シアリダーゼを産生し、それが培地に漏洩した場合、シアロエリスロポエチン突然変異タンパク質を高い効率で分解する（例えば、Gramerら、1995 *Biotechnology* 13:69 2-698）。（例えば、Ferrariら、1994, *Glycobiology* 4:367-373で提供される情報から）当業者に周知の方法を用いて、細胞株をトランスフェクトし、突然変異させ、または別の方法で、構成的なシアリダーゼの産生を引き起こすことができる。このような方法で、アシアロエリスロポエチン突然変異タンパク質は、アシアロエリスロポエチン突然変異タンパク質の製造の際に、産生され得る。

【0196】

組換え細胞は、温度、インキュベーション時間、光学密度および培地組成の標準的な条件下で培養されうる。あるいは、改変された培養条件および培地が、組換え型組織保護サイトカインの産生を向上させるために使用される。例えば、組換え細胞は、誘導性の組換え型組織保護サイトカイン発現を促進する条件下で増殖される。当技術分野において公知の技術は、組換え型組織保護サイトカインの産生のための最適条件を確立するために適用されうる。組換え型組織保護サイトカインを単離するために、組換え型組織保護サイトカインを含む細胞溶解物または抽出物を更に精製してもよい。

【0197】

組換え型組織保護サイトカインの精製を容易にするため、マーカーアミノ酸配列は、市販の他の多くのものの中で、pQEベクター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）で提供されるタグのようなヘキサヒスチジンペプチドである。例えば、Gentzら、1989, *PNAS* 86:821に記載されるように、ヘキサヒスチジンは、便利な融合タンパク質の精製を提供する。精製のために有用な他のペプチドタグは、インフルエンザ血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに相当する血球凝集素「HA」タグ（Wilsonら、1984, *Cell* 37:767）、および「flag」タグを含むが、それらに限定されない。当技術分野において公知の任意の精製方法が使用できる（例えば、国際特許公開W0 93/21232；欧州特許第439,095号；Naramuraら、1994, *Immunol. Lett.* 39:91-99；米国特許第5,474,981号；Gilliesら、1992, *PNAS* 89:1428-1432；およびFellら、1991, *J. Immunol.* 146:2446-2452を参照）。

【0198】

5.4. 組換え型組織保護サイトカインの組織保護特性のためのアッセイ 30

組換え型組織保護サイトカインの製造に続いて、また、一部の実施形態では本発明のこのような組織保護サイトカインの更なる化学的修飾に続いて、当業者は、周知のアッセイを用いて、そのサイトカインの組織保護特性および骨髄に対する影響の欠如を確認できる。

【0199】

例えば、組換え型組織保護サイトカインの非赤血球産生作用は、TF-1アッセイの使用を通して確認できる。このアッセイでは、TF-1細胞を、5 ng/mlのGM-CSFおよび10% FCSを添加した完全RPMI培地において1日間37℃でCO₂インキュベーター内で増殖させる。その後、細胞を飢餓培地（GM-CSFを含まない5% FCS）で洗浄し、飢餓培地中で16時間 10⁶細胞/mlの密度で懸濁する。96ウェルプレートを用意するにあたり、（1）湿度を維持するために、外側のウェルに100 μlの滅菌水を加える、（2）5ウェルに培地（細胞もGM-CSFも含まない10% FCS）のみを加える、（3）残りのセル（試験されるサイトカインあたり5ウェル）には10% FCSおよび組換え型組織保護サイトカインを含む培地に25,000個/ウェルの細胞を播種する。細胞が増殖する場合、組換え型組織保護サイトカインは赤血球産生性でありうる。その後、その化合物のin vivoでの効果を、組換え型組織保護サイトカインによるヘマトクリットの増加をモニタリングするin vivoアッセイにおいて試験すべきである。ネガティブな結果、すなわちTF-1でのin vitroアッセイにおいて細胞が増殖しないこと、および/またはin vivoアッセイにおいてヘマトクリットが上昇しないことは、組換え型組織保護サイトカインが非赤血球産生性であることを意味する。

【0200】

上述のTF-1アッセイの代替として、当業者は、当技術分野において公知の他の赤血球産生アッセイを使用してもよく、それは下記実施例の項に記載されるようなUT-7細胞アッセイを含むがそれに限定されない。

【0201】

組換え型組織保護サイトカインの組織保護特性は、P-19でのin vitroアッセイ、またはマウスでの水中毒in vivoアッセイを用いて検証されてもよく、ともに下記において更に詳細に概説される。代替アッセイは、下記実施例において概説される更なるアッセイ、PC-12アッセイおよび海馬スライスアッセイなどを含むが、それらに限定されない。上記のアッセイは単に例として提示され、組換え型組織保護サイトカインの組織保護効果および/または骨髄への影響を調べるための当業者にとって公知の他の適切なアッセイは、同様に使用することができる。

10

【0202】

5.5. 本発明の医薬組成物

本発明のある態様の実施において、上述のような組換え型組織保護サイトカインを含む医薬組成物は、十分なレベルの組換え型組織保護サイトカインを血管系に供給する任意の投与方法によって哺乳動物に投与でき、内皮細胞関門を越える移行および応答細胞に対する有益な効果を可能にしうる。組織または器官を灌流する目的で使用する場合、同様の結果が望ましい。エリスロポエチン突然変異タンパク質を生体外での灌流のために用いる事例では、組換え型組織保護サイトカインは、前述の組換え型組織保護サイトカインのような、任意の型のエリスロポエチン突然変異タンパク質でありうる。細胞もしくは組織が非血管性である事例、および/または、投与が細胞もしくは組織を本発明の組成物に浸すことによる事例では、医薬組成物は、有効な応答性細胞に有益な量の組換え型組織保護サイトカインを供給する。組換え型組織保護サイトカインが移行しうる内皮細胞関門は、密着結合、有孔結合、有窓結合、および他の任意の種類哺乳動物に存在する内皮関門を含む。好ましい関門は内皮細胞密着結合であるが、本発明はそのように限定されない。

20

【0203】

前述の組換え型組織保護サイトカインは一般的に、主として神経症状もしくは精神科的症状、眼科疾患、心血管疾患、心肺疾患、呼吸器疾患、腎臓、泌尿器および生殖系の疾患、胃腸疾患ならびに内分泌および代謝異常を有する、ヒトの中樞神経系または末梢神経系の疾患の治療あるいは予防的処置のために有用である。特に、このような状態および疾患は低酸素状態を含み、それは、中樞神経系組織、末梢神経系組織、あるいは、心臓または網膜組織中の興奮性組織など、例えば脳、心臓もしくは網膜/目などの、興奮性組織に悪影響を及ぼす。従って、本発明は、様々な状態および状況において低酸素状態から生じる、興奮性組織の損傷を治療または予防するために使用され得る。このような状態および状況の非限定的な例は、下記の表において示される。

30

【0204】

本発明に従って治療可能な神経組織病変保護の例において、このような病変は、神経組織の酸素化能の低下に起因するものを含む。神経組織に対して酸素の利用能を低下させ、ストレス、損傷、および最終的に神経細胞死を引き起こす状態は、本発明の方法によって治療できる。通常、低酸素症および/または虚血と呼ばれるこれらの状態は、発作、血管閉塞、出生前もしくは出生後の酸素欠乏、窒息、息詰まり、溺水、一酸化炭素中毒、煤煙吸入、手術および放射線治療を含む外傷、呼吸停止、てんかん、低血糖症、慢性閉塞性肺疾患、気腫、成人呼吸窮迫症候群、低血圧ショック、敗血症性ショック、アナフィラキシーショック、インスリンショック、鎌状赤血球貧血、心停止、律動不整、窒素中毒、ならびに、心肺バイパス手術により引き起こされる神経障害に起因するか、あるいは、これらを含むが、これらに限定されない。

40

【0205】

ある実施形態では、例えば、特定の組換え型組織保護サイトカイン組成物は、傷害もしくは傷害の危険から生じた組織損傷、または、例えば、腫瘍切除もしくは動脈瘤治療などの外科手術の際の組織損傷を予防するために投与され得る。本明細書に記載される方法に

50

よって治療可能な、低血糖症に起因するまたはそれから生じる他の病変としては、インスリン過剰投与（医原性高インスリン血症とも称される）、インスリノーマ、成長ホルモン欠損症、低コルチゾール血症、薬物過剰摂取およびある種の腫瘍が含まれる。

【0206】

興奮性神経組織の損傷から生じる他の病変は、てんかん、痙攣、または慢性痙攣障害などの痙攣障害を含む。他の治療可能な状態および疾患は、発作、多発性硬化症、低血圧、心停止、アルツハイマー病、パーキンソン病、脳性麻痺、脳脊髄の損傷、AIDS痴呆、加齢による認知機能の喪失、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、痙攣障害、アルコール中毒症、網膜虚血、緑内障から生じる視神経損傷および神経細胞脱落などの疾患を含むが、それらに限定されない。

【0207】

本発明の特定の組成物および方法は、疾患状態または様々な損傷から生じる炎症、物理的もしくは化学的に誘導される炎症などを治療するために使用されうる。このような損傷は、血管炎、慢性気管支炎、膵炎、骨髄炎、関節リウマチ、糸球体腎炎、視神経炎、側頭動脈炎、脳炎、髄膜炎、横断脊髄炎、皮膚筋炎、多発性筋炎、壊死性筋膜炎、肝炎および壊死性腸炎を含みうる。

【0208】

活性化された星状細胞は神経毒を産生することでニューロンに対する細胞毒性の役割を果たしうるということが証拠により実証されている。一酸化窒素、活性酸素種、およびサイトカインは脳虚血に反応してグリア細胞から放出される（Becker, K.J. 2001. Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke. *Curr Opin Neurol* 14:349-353ならびにMattson, M.P., Culmsee, C., およびYu, Z.F. 2000. Apoptotic and Antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301:173-187を参照）。神経変性のモデルにおいて、グリアの活性化およびそれに続く炎症性サイトカインの産生は一次性的な神経損傷に依存することが研究により実証されている（Viviani, B., Corsini, E., Galli, C.L., Padovani, A., Ciusani, E., およびMarinovich, M. 2000. Dying neuronal cells activate glia through the release of a protease product. *Glia* 32:84-90ならびにRabuffetti, M., Scioratti, C., Tarozzo, G., Clementi, E., Manfredi, A.A., およびBeltramo, M. 2000. Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone includes long lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 20:4398-4404を参照）。炎症およびグリアの活性化は、様々な種類の神経変性障害、例えば脳虚血、脳損傷および実験的なアレルギー性脳脊髄炎、エリスロポエチンが細胞保護効果を発揮する障害に共通している。エリスロポエチンによるサイトカイン産生の阻害は、その保護効果を少なくとも部分的に仲介すると考えられる。しかし、直接的に腫瘍壊死因子の産生を抑制するIL-10およびIL-13などの「古典的な」抗炎症性サイトカインとは異なり、エリスロポエチンは神経細胞死の存在下でのみ活性を有すると思われる。

【0209】

任意の特定の理論によって束縛されることを望まないが、この抗炎症活性はいくつかの非限定的な理論によって仮説的に説明されうると思われる。第一に、エリスロポエチンはアポトーシスを抑制するので、アポトーシスによって誘導される炎症性の事象は抑制されるであろう。更に、エリスロポエチンは、瀕死のニューロンからのグリア細胞を活性化する分子シグナルの放出を抑制するかもしれない、または、グリア細胞に直接作用し、これらの産物に対するそれらの反応を減少させるかもしれない。別の可能性は、エリスロポエチンが、アポトーシスと炎症との両方を誘導する炎症性カスケードのより近位のメンバー（例えば、カパーゼ1、反応性酸素、または、窒素中間体）を標的とすることである。

【0210】

更に、エリスロポエチンは、一般的にデキサメタゾンのような他の抗炎症性化合物に付随するリバウンド作用なしに、抗炎症性保護を提供すると思われる。また、任意の特定の理論によって束縛されることを望まないが、あたかもこれは一酸化窒素（NO）などの多目

10

20

30

40

50

的の神経毒に対するエリスロポエチンの作用に起因するようになる。活性化された星状細胞およびマイクログリアは様々な外傷に反応して神経毒量のNOを生成するが、NOは体内で本質的な生理機能の調節を含む多くの目的を果たす。従って、抗炎症薬の使用は、NOまたは他の神経毒を抑制することによって炎症を緩和しうるが、その抗炎症薬が長過ぎる半減期を有する場合、それはまた、炎症を引き起こした外傷から生じる損傷を修復するこれらの化学物質の役割を妨げるかもしれない。本発明の組換え型組織保護サイトカインはNOのような神経毒の修復能力を妨げることなく炎症を緩和できると仮定される。

【0211】

本発明の特定の組成物および方法を用いて、網膜組織の症状および損傷を治療することができる。このような障害としては、網膜虚血、黄斑変性、網膜剥離、色素性網膜炎、動脈硬化性網膜症、高血圧性網膜症、網膜動脈閉塞、網膜静脈閉塞、低血圧症、および糖尿病性網膜症が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0212】

他の実施形態において、本発明の方法の原理は、興奮性組織への放射線障害から生じる損傷を保護または治療するために使用することができる。本発明の方法の他の用途は、神経毒中毒症（例えば、ドウモイ酸（domoic acid）による貝中毒、神経ラシリズム（neuro lathyrism）およびGuam病）、筋萎縮性側索硬化症、およびパーキンソン病の治療においてである。

【0213】

上記のように、本発明は、上記のような組換え型組織保護サイトカインの末梢投与により哺乳動物における興奮性組織の機能を増強する方法にも関する。この方法を用いた治療により、種々の疾患および症状を治療することができ、さらにこの方法は、何の症状も疾患もない場合に認知機能を増強するのに有用である。本発明のこれらの使用（ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方における学習および訓練の増強を含む）について、以下にさらに詳しく記載する。

20

【0214】

本発明のこの態様の方法によって治療することができる中枢神経系に関係する症状および疾患としては、気分障害、不安障害、うつ病、自閉症、注意欠陥過活動性障害、および認知機能障害が挙げられるが、これらに限定されない。これらの症状は神経細胞機能の増強により恩恵を得る。本発明の教示に従って治療することができる他の障害には、例えば、睡眠障害、睡眠時無呼吸、および旅行に関する障害；クモ膜下および動脈瘤出血、低血圧性ショック、振とう症傷害、敗血症性ショック、アナフィラキシーショック、および種々の脳炎および髄膜炎（例えば、狼瘡などの結合組織疾患に関する脳炎）の続発症が含まれる。他の用途としては、神経毒による中毒（例えば、ドウモイ酸による貝中毒、神経ラシリズムおよびGuam病）、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病；塞栓性もしくは虚血性傷害の術後の処置；全脳放射線照射；鎌状赤血球発症；ならびに子癇の予防またはこれらからの保護が挙げられる。

30

【0215】

本発明の方法によって治療することができる更なる症状群としては、遺伝性もしくは後天性のミトコンドリア機能障害（神経の損傷および死を典型とする様々な神経疾患の原因となる）が挙げられる。例えば、リー病（亜急性壊死性脳障害）は、ニューロン脱落による視力低下の進行と脳障害および筋障害を特徴とする。これらの場合、不完全なミトコンドリア代謝により、興奮性細胞の代謝の燃料となる高エネルギー物質を十分に供給することができない。エリスロポエチン受容体活性調節因子は、様々なミトコンドリア疾患において弱まった機能を最適にする。上記のように、低酸素状態は、興奮性組織に悪影響を及ぼす。興奮性組織としては、中枢神経系組織、末梢神経系組織、および心臓が挙げられるが、これらに限定されない。上記症状に加えて、本発明の方法は、一酸化炭素および煙の吸入などの吸入中毒、重度の喘息、成人呼吸促進症候群、ならびに窒息および溺水の治療において有用である。低酸素状態を引き起こすまたは何らかにより興奮性組織の損傷を誘導する更なる症状としては、インスリンの不適切な投与において生じ得るまたはインス

40

50

リン産生新生物（インスリノーマ）を有する低血糖症が挙げられる。

【0216】

興奮性組織の損傷が原因であると考えられている様々な神経心理学的障害は、本発明の方法によって治療可能である。本発明による治療が提供される神経細胞の損傷が関与している慢性疾患には、中枢神経系および/または末梢神経系に関係する障害（老化による認知機能の低下および老人性痴呆、慢性発作障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、痴呆、記憶喪失、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、結節硬化症、ウィルソン病脳および進行性核上性麻痺、Guam疾患、レーヴィ小体痴呆、プリオン疾患（例えば、クロイツフェルト-ヤコブ病、ハンティングトン病、筋緊張性ジストロフィー、フリートライヒ運動失調および他の運動失調などの海綿状脳障害）、ジル・ド・ラ・ツレット症候群、癲癇などの発作障害および慢性発作障害、卒中、脳もしくは脊髄の外傷、AIDS痴呆、アルコール中毒症、自閉症、網膜虚血、緑内障、高血圧症や睡眠障害等の自律神経機能障害、ならびに神経精神障害（精神分裂病、分裂情動性障害、注意欠陥障害、気分変調性障害、大うつ病、躁病、強迫性障害、精神活性物質使用障害、不安、パニック障害、一極性および双極性情動障害を含むが、これらに限定されない）が含まれる。更なる神経精神障害および神経変性障害としては、例えば、米国精神医学協会（American Psychiatric Association）による精神障害の診断および統計マニュアル（Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders, DSM）に記載されているものがあり、最新版IVを本明細書中に参考として全て組み込まれる。

10

【0217】

他の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインを含む組換えキメラ毒素分子は、癌などの増殖性障害または亜急性硬化性汎脳炎などのウイルス性障害を治療するための、毒素の治療的送達のために用いることができる。

20

【0218】

以下の表は、上記の組換え型組織保護サイトカインによって治療することができる様々な症状および疾患の更なる非限定的な適応症を列挙している。

【0219】

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状又は疾患	タイプ
心臓	虚血	冠状動脈疾患	急性、慢性、 安定、不安定
		心筋梗塞	ドレスラー症候群
		アングナ	
		先天性心疾患	弁膜性、心筋症
		プリンズメタル型狭心症	
		心臓破裂	動脈瘤性 鼻中隔穿孔
		血管炎	
	不整脈	頻脈-、徐脈不整脈、 上室性、心室性、 伝導異常	安定、不安定、 過敏性頸動脈洞節
	うっ血性心不全	左心室、右心室、両心室、 収縮期性、拡張期性	心筋症(特発性家族性、 感染性、代謝性の、沈着 症、不全症、結合組織障 害、浸潤及び肉芽腫、神 経血管性等)
		心筋炎	自己免疫性、感染、 突発性
		肺性心	
	鈍傷及び穿通損傷		
	毒素	コカイン中毒	
血管	高血圧症	原発性、続発性	
	潜函病		
	線維筋過形成		
	動脈瘤	解離性、破裂性、拡大性	
肺	閉塞	喘息、 慢性気管支炎、 気腫及び気道閉塞	
	虚血性肺疾患	肺動脈塞栓症、 肺動脈血栓症 脂肪塞栓症	
	環境肺疾患		
	虚血性肺疾患	肺動脈塞栓症 肺動脈血栓症	
	間質性肺疾患	特発性肺線維症	
	先天性	嚢胞性線維症	
	肺性心		
	外傷		
	肺炎及び肺実質炎	感染性、寄生性、毒性、 外傷性、火傷、吸引	
	サルコイドーシス		
脾臓	内分泌	真性糖尿病I型及びII型	ベータ細胞の不全、機能 障害、 糖尿病性神経障害
		脾臓の他の内分泌細胞 不全	
	外分泌	脾臓外分泌不全	脾炎

10

20

30

40

骨	オステオペニア	原発性 続発性	性腺機能低下症 不動化	
			閉経後の老化による 上皮小体機能亢進症 甲状腺機能亢進症 カルシウム、マグネシウ ム、リン及びノ又は ビタミンD欠乏	
	骨髄炎			
	無血管性壊死			
	外傷			
	パジェット病			
皮膚	脱毛症	限局性 全体性	原発性 続発性 男性型禿頭症	
	白斑	限局性 広汎性	原発性 続発性	
	糖尿病性潰瘍化			
	末梢血管疾患			
	火傷			
自己免疫障害	独瘡 紅斑 シェーグレン 慢性関節リウマチ 糸球体腎炎 血管炎			
	ランゲルハンス組織球 増殖症			
眼	視神経炎 鈍傷及び穿通損傷、 感染症、サルコイド、 鎌状赤血球C症、 網膜剥離、 側頭動脈炎、 網膜虚血、黄斑変性、 色素性網膜炎、 動脈硬化性網膜症、 高血圧性網膜症、 網膜動脈ブロック、 網膜静脈ブロック、 低血圧症、 糖尿病性網膜症、 黄斑浮腫			
胚及び胎児障害	仮死			
	虚血			

10

20

30

40

CNS	慢性疲労症候群、 急性及び慢性の低浸透 及び高浸透症候群、 AIDS痲果、感電死		
	脳炎	狂犬病、疱疹	
	髄膜炎		
	硬膜下血腫		
	ニコチン中毒		
	薬物の乱用及び 禁断症状	コカイン、ヘロイン、 クラック、マリファナ、 LSD、PCP、多重薬物 乱用、エクスタシー、 オピオイド、催眠鎮静薬、 アンフェタミン、カフェイン	
ENT	強迫性障害 脊髄狭窄症、 横断脊髄炎、 ギラン・バレー症、 外傷、 神経根圧迫症、 腫瘍状圧迫症 心臓発作		
	耳鳴 ムニエ症候群 (Meuniere syndrome) 聴覚障害 外傷性損傷、気圧障害		20
腎臓	腎不全	急性、慢性	血管性／虚血性、腸管 疾患、糖尿病性腎臓 疾患、ネフローゼ症候群、 感染症、損傷、 コントラスト誘導性、 化学療法誘導性、 CPB誘導性、予防的
	ヘーノホーシェンライン 紫斑病		30
横紋筋	自己免疫障害	重症筋無力症 皮膚筋炎 多発性筋炎	
	筋障害	遺伝性代謝性、 内分泌性及び毒性、	
	心臓発作		
	挫滅傷		
	横紋筋融解 (Rhabdomyolysis)		
	ミトコンドリア疾患		
性機能障害	感染症	壊死性筋膜炎	40
	中枢及び末梢 (例: 勃起機能障害)	薬物投与に二次的な 不能症、(糖尿病)	

肝臓	肝炎	ウイルス性、細菌性、 寄生性	
	虚血性疾患		
	肝硬変、脂肪肝		
	浸潤性／代謝性疾患		
胃腸	虚血性腸疾患		
	炎症性腸疾患		
	壊死性腸炎		
器官移植	ドナー及び受容者の治療		
生殖道	不妊症	血管 自己免疫 子宮異常 体内移植障害	
内分泌	腺の機能亢進及び 機能低下		

10

【0220】

上記の通り、これらの疾患、障害または症状は、本発明の組換え型組織保護サイトカインによって提供される恩恵の範囲の単なる例示である。従って、本発明は一般に、機械的外傷の結果またはヒト疾患の治療的もしくは予防的処置を提供する。CNSおよび/または末梢神経系の疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が好ましい。精神医学的要素を有する疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が提供される。眼、心血管、心肺、呼吸器系、腎臓、尿道、生殖器、胃腸、内分泌性または代謝性の要素を持つもの等（ただしこれらに限定されない）の疾患、障害または症状の治療的もしくは予防的処置が提供される。

20

【0221】

1つの実施形態において、組換え型組織保護サイトカインのこのような医薬組成物は、標的細胞、組織または器官を保護または増強するために全身に投与することができる。このような投与は、非経口、吸入、または粘膜経路（例えば、口内、鼻腔内、直腸内、膈内、舌下、粘膜下、または経皮投与）で行われる。好ましくは、投与は、例えば静脈内もしくは腹腔内注射による非経口経路であり、例えば動脈内、筋肉内、皮内および皮下投与が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0222】

灌流液の使用、器官内への注射または他の局所投与などによる他の投与経路の場合、上記と同様のレベルの組換え型組織保護サイトカインをもたらす医薬組成物が提供される。約0.01pM～30nMのレベルが好ましい。

【0223】

本発明の医薬組成物は、治療に有効な量の化合物および製薬上許容される担体を含み得る。特定の実施形態において、「製薬上許容される」という用語は、動物（特にヒト）への使用が、連邦政府または州政府の取締機関により認証されていること、または米国薬局方もしくは他の一般に認識されている外国薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療剤と一緒に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。このような医薬用担体は、無菌の液体（例えば、生理食塩水、または石油、動物、植物もしくは合成起源の油（例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油を含む））であってもよい。医薬組成物を静脈内投与する場合は、生理食塩水が好適な担体である。特に注射用溶液の場合は、生理食塩水、デキストロース水溶液およびグリセロール水溶液を液体担体として使用することもできる。好適な医薬用添加剤としては、澱粉、ブドウ糖、乳糖、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、コムギ、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水およびエタノールなどが挙げられる。望ましい場合、組成

40

50

物は、少量の湿潤剤、乳化剤、またはpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液剤、懸濁液剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉剤、および持続放出性製剤などの形態をとることができる。この組成物は、慣用の結合剤および担体（例えば、トリグリセリド）と一緒に坐剤として製剤化することができる。本発明の組成物は、中性または塩の形態で製剤化することができる。薬学的に許容される塩としては、遊離アミノ基と共に形成されたもの（例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されたもの）、ならびに遊離カルボキシル基と共に形成されたもの（例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されたもの）が挙げられる。好適な医薬用担体の例は、E.W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。このような組成物は、治療上有効な量の該化合物（好ましくは純粋な形態）を、患者への投与に適した形状にするために適量の担体と一緒に含む。製剤は、投与様式に見合ったものでなければならない。

【0224】

経口投与用の医薬組成物は、カプセル剤もしくは錠剤として、粉剤もしくは顆粒剤として、（水性もしくは非水性液体中の）溶液剤、シロップ剤もしくは懸濁液剤として、食用フォーム剤もしくはホイップ剤として、または乳剤として提供されてもよい。錠剤もしくは硬ゼラチンカプセルは、乳糖、澱粉もしくはその誘導体、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、ステアリン酸もしくはその塩等を含み得る。軟ゼラチンカプセルは、植物油、ろう、脂肪、半固体もしくは液体ポリオール等を含み得る。溶液剤およびシロップ剤は、水、ポリオールおよび糖類を含み得る。

【0225】

経口投与のための有効成分は、胃腸管内での有効成分の分解および/または吸収を遅らせる物質（例えば、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレート）でコーティングしたり、このような物質と混合したりしてもよい。このように、有効成分の持続放出は、数時間にわたって行ってもよいし、必要であれば、有効成分が胃の中で分解されないようにすることができる。経口投与用の医薬組成物は、特定のpHまたは酵素条件のために胃腸内の特定の位置で有効成分を放出しやすくするように製剤化してもよい。

【0226】

経皮投与用の医薬組成物は、レシピエントの表皮に長時間密着させておくための個別のパッチ剤として提供されてもよい。局所投与用の医薬組成物は、軟膏剤、クリーム剤、懸濁液剤、ローション剤、粉剤、溶液剤、ペースト剤、ゲル剤、スプレー剤、エアロゾル剤またはオイル剤として提供されてもよい。皮膚、口、眼または他の外部組織への局所投与用には、表面塗布用の軟膏剤またはクリーム剤を使用することが好ましい。軟膏剤として製剤化する場合には、有効成分をパラフィン系もしくは水混和性の軟膏基剤と一緒に使用することができる。あるいは、有効成分は、水中油型基剤または油中水型基剤を用いてクリーム剤として製剤化することができる。眼への局所投与用の医薬組成物としては、点眼剤が挙げられる。これらの組成物中において、有効成分は、適当な担体（例えば水性溶媒）に溶解もしくは懸濁させることができる。口内への局所投与用の医薬組成物としては、ロゼンジ剤、薬用ドロップおよびマウスウォッシュが挙げられる。

【0227】

鼻腔内および肺投与用の医薬組成物は、粉末（好ましくは20~500ミクロンの粒径を有するもの）などの固体担体を含み得る。粉末は、鼻でかぐようにして（すなわち鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻でさっと吸入することにより）投与することができる。あるいは、鼻腔内投与用の組成物は、液体担体を含み得る（例えば、鼻腔内スプレーまたは点鼻剤）。あるいは、深く吸入したり、またはマウスピースを介して咽頭口腔部に装置を据え付けることによって、肺への直接吸入を行ってもよい。これらの組成物は、有効成分の水性もしくは油性溶液を含み得る。吸入投与用の組成物は、所定用量の有効成分を提供するように構築することができる専用デバイス（加圧エアロゾル、ネブライザー、または注入器を含むがこれらに限定されない）に入れて供給される。好適な実施形態において、

本発明の医薬組成物は、鼻腔内に直接、または鼻腔もしくは咽頭口腔部を介して肺に投与される。

【0228】

直腸投与用の医薬組成物は、坐剤または浣腸剤として提供することができる。膣内投与用の医薬組成物は、ペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル剤、ペースト剤、フォーム剤またはスプレー剤として提供することができる。

【0229】

非経口投与用の医薬組成物としては、水性および非水性の無菌注射用溶液剤もしくは懸濁液剤が挙げられ、これらは、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および投与を受けるレシピエントの血液と該組成物がほぼ等張となるようにする溶質を含み得る。このような組成物中に含まれ得る他の成分としては、例えば水、アルコール、ポリオール、グリセリンおよび植物油が挙げられる。非経口投与用の組成物は、1回用量もしくは複数回分の用量の容器（例えば密閉アンプルおよびバイアル）に入れて提供され、使用直前に無菌の液体担体（例えば、注射用無菌生理食塩水）を加えるだけですむように、凍結乾燥状態で保存することができる。用時調製注射用溶液および懸濁液は、無菌粉剤、顆粒剤および錠剤から調製することができる。1つの実施形態において、救急車、救急室、および戦場といった状況下での緊急時の使用のために、また、家庭内状況における自己投与のために（特に、例えば芝刈り機の不注意な使用による外傷性切断の可能性が生じ得る場合）、組換え型組織保護サイトカインの注射用溶液を含む自己注射器が提供される。切断された身体部分の複数の部位に組換え型組織保護サイトカインをできるだけ早く投与することによって、たとえ現場に医師が到着する前もしくは足指が切断された患者が運ばれて救急室に到着する前であっても、切断された足または足指の細胞および組織が再び取りつけられた後に生き残る可能性を高くすることができる。

【0230】

好適な実施形態において、組成物は、ヒトへの静脈内投与用の医薬組成物として慣用の手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与用の組成物は、無菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要であれば、組成物は、可溶化剤および注射部位の痛みを和らげるリドカイン等の局所麻酔剤も含み得る。一般的に、これらの成分は別々にまたは単位剤形の中に一緒に混合して（例えば、有効成分の量を示すアンプルや小袋などの気密容器に入れた凍結乾燥粉末または水不含の濃縮物として）供給される。組成物を注入により投与する場合は、医薬品級の滅菌水もしくは生理食塩水を含む注入ボトルと共に組成物を提供することができる。組成物を注射により投与する場合は、投与前に成分を混合することができるように、無菌食塩水の入ったアンプルを提供することができる。

【0231】

一般に坐剤は有効成分を0.5~10重量%の範囲で含み、経口投与用製剤は好ましくは有効成分を10%~95%含む。

【0232】

*in situ*灌流のため、または臓器を摘出する前に臓器提供者の血管に投与するために、移植臓器浴で使用するための灌流液組成物を提供することができる。このような医薬組成物は、個体への急性もしくは慢性の局部投与または全身投与には適さないレベルもしくは形態の組換え型組織保護サイトカインを含み得るが、医薬組成物が死体、臓器浴、臓器灌流液、または*in situ*灌流において本明細書中で意図される機能を果たしてから、処理した臓器または組織を正常な循環にさらすもしくは戻す前に、その中に含まれる組換え型組織保護サイトカインのレベルを除去または減少させるものである。

【0233】

また本発明は、本発明の医薬組成物の成分のうちの1つ以上を充填した1つ以上の容器を含む医薬パックもしくはキットも提供する。場合により、このような容器に、医薬品もしくは生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定されたフォームで書かれた注意書き（この注意書きはヒト投与のための製造、使用または販売を規制する管轄機関による認可を反映する）を添えることができる。

【0234】

1つの実施形態において、例えば、組換え型組織保護サイトカインは制御放出システムで送達することができる。例えば、ポリペプチドは静脈内注入、移植用浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、または他の投与様式を用いて投与することができる。1つの実施形態においては、ポンプを使用することができる（以下の文献を参照されたい：Langer（前掲）；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201；Buchwaldら, 1980, Surgery 88:507；Saudekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574）。他の実施形態において、化合物は小胞（特にリポソーム）内に保持させて送達することができる（以下の文献を参照されたい：Langer, Science 249:1527-1533(1990)；Treatら, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler（編）, LissNew York, pp.353-365(1989)；国際特許出願公開W0 91/04014；米国特許第4,704,355号；Lopez-Berestein, 同書, pp.317-327；一般に同書を参照されたい）。別の実施形態においては、高分子材料を用いることができる（以下の文献を参照されたい：Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise(編)、CRC Press；Boca Raton, Florida, 1974；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(編), Wiley: New York (1984)；RangerおよびPappas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1953；また以下の文献も参照されたい：Levyら, 1985, Science 228:190；Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351；Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71:105）。

【0235】

さらに他の実施形態において、制御放出システムを治療標的（すなわち、標的となる細胞、組織または器官）の近傍に設置することができる。こうすることにより、全身投与で必要とされる用量に比べて少ない用量しか必要としなくなる（例えば、Goodson, pp.115-138 in Medical Applications of Controlled Release, Vol. 2(前掲), 1984を参照されたい）。他の制御放出システムは、Langerのレビュー（1990, Science 249:1527-1533）に記載されている。

【0236】

他の実施形態において、適切に製剤化された組換え型組織保護サイトカインは、鼻腔内、口腔内、直腸内、膈内、または舌下投与により投与することができる。

【0237】

特定の実施形態において、治療を必要とする領域に本発明の組換え型組織保護サイトカイン組成物を局所投与することが望ましい。これは、例えば（ただし限定するわけではない）外科手術中の局所注入により、外用適用（例えば外科手術後の創傷包帯と組み合わせた適用）、注射、カテーテル、坐剤、またはインプラントを用いて、行うことができる。インプラントは、多孔質、非多孔質、またはゼラチン質の材料（シラスチック膜などの膜または繊維を含む）からできている。

【0238】

好適な有効用量の選択は、当業者に公知である幾つかの要因を考慮して専門家により決定される。このような要因としては、組換え型組織保護サイトカインの具体的な形態、ならびにその薬物動態パラメータ、例えばバイオアベイラビリティ、代謝、半減期など（これらは医薬化合物の規制認可を得る際に一般に使用される一般開発手続において確立されている）が挙げられる。用量決定の際に考慮される更なる要因としては、治療される症状もしくは疾患、または正常個体で達成される利益、患者の体重、投与経路、投与が急性であるか慢性であるか、併用薬物治療の有無、および投与された薬剤の効力に影響を及ぼすことが周知の他の要因が挙げられる。したがって、正確な投薬量は、標準的な臨床技法に従って、医師の判断および各患者の状況に応じて（例えば個々の患者の体調および免疫状態等に応じて）決定されるべきである。

【0239】

本発明の他の態様においては、移植用臓器の灌流および保存のための灌流液または灌流溶液が提供される。灌流溶液は、応答性細胞および関連する細胞、組織もしくは器官を保

護するのに有効な量の組換え型組織保護サイトカインを含む。移植には、器官（細胞、組織または他の身体部分を含む）をある提供者から摘出して別の受容者に移植する異種間移植、および、身体の一部から器官を取り出して他の部位に移植する自己移植（例えば、腫瘍切除のために器官を取り出し、*ex vivo*で切除、修復または処理してから元の場所に戻すベンチ外科手術を含む）が含まれるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、灌流溶液は、約1~約25U/mlエリスロポエチン、5%ヒドロキシエチル澱粉（分子量約200,000~約300,000であり、エチレングリコール、エチレンクロロヒドリン、塩化ナトリウムおよびアセトンを実質的に含まない）、25mM KH_2PO_4 、3mMグルタチオン、5mMアデノシン、10mMグルコース、10mM HEPES緩衝液、5mMグルコン酸マグネシウム、1.5mM CaCl_2 、105mMグルコン酸ナトリウム、200,000単位のペニシリン、40単位のインスリン、16mgのデキサメタゾン、12mgのフェノールレッドを含む、pH7.4~7.5、重量モル浸透圧約320 mOsm/lの、ウイスコンシン大学（UW）溶液（米国特許第4,798,824号）である。この溶液は、移植前に死体の腎臓および脾臓を維持するために用いられる。この溶液を用いると、死体腎の保存に推奨される30時間の限度を超えて保存することができる。この特定の灌流液は、有効量の組換え型組織保護サイトカインを含ませることによって本発明の用途に適合させることができる多くのこのような溶液のうちの単なる例である。さらなる実施形態において、灌流溶液は、約0.01 pg/ml~約400 ng/mlの組換え型組織保護サイトカイン、または約40~約300 ng/mlの組換え型組織保護サイトカインを含む。上記のように、本発明のこの態様においては任意の形態の組換え型組織保護サイトカインを使用することができる。

10

20

【0240】

本明細書中を通じて記載される目的のための組換え型組織保護サイトカインの好適な受容者はヒトであるが、本明細書に記載する方法は他の哺乳動物（特に、飼育動物、家畜、ペットおよび動物園の動物）に同様に適用することができる。しかし、本発明はそれらの動物に限定されず、恩恵はあらゆる哺乳動物に適用することができる。

【0241】

5.6. 組換え型組織保護サイトカインの治療および予防用途

以下の実施例1に記載するように、エリスロポエチン受容体がヒト脳の毛細管内皮に存在することは、本発明の組換え型組織保護サイトカインの標的がヒト脳に存在すること、および本発明のこれらの組換え型組織保護サイトカインに関する動物研究がヒトの治療または予防に直接適用可能であることを示している。

30

【0242】

本発明の他の態様においては、組換え型組織保護サイトカインを含む医薬組成物に細胞、組織もしくは器官を直接曝露することにより、または、その組織もしくは器官の脈管構造に組換え型組織保護サイトカイン含有医薬組成物を投与するもしくは接触させることにより、内皮細胞閉門により脈管構造から隔離されていない細胞、組織または器官の生存能を増強するための方法および組成物が提供される。処理された組織または器官の中の応答性細胞の活性の増強により、プラスの効果が発揮されるようになる。

【0243】

上記のように、本発明は、エリスロポエチン分子が、管腔表面から、内皮細胞の密着接合部を有する器官（例えば、脳、網膜、および精巣などを含む）の毛細管の内皮細胞の基底膜表面へと輸送され得る、という発見に一部基づくものである。このように、閉門を越える応答性細胞は、組換え型組織保護サイトカインの有益な影響を受け易い標的であり、また、応答性細胞を含み且つそれらに全てもしくは一部依存する他の細胞型、組織または器官も、本発明の方法の標的である。いかなる特定の理論にも拘束されないが、組換え型組織保護サイトカインのトランスサイトーシスの後、組換え型組織保護サイトカインは、例えば神経、網膜、筋肉、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣、脾臓、骨、皮膚、もしくは子宮内膜の細胞などの応答性細胞上のエリスロポエチン受容体と相互作用することができる。そして受容体に結合することにより、応答性細胞もしくは組織内の遺伝子発現プログラムを活性化して、毒素、化学療法剤、放射

40

50

線療法、低酸素症などの傷害から細胞、組織もしくは器官を保護するシグナル伝達カスケードを始動することができる。このように、損傷または低酸素性ストレスから応答性細胞を含む組織を保護して、このような組織の機能を増強するための方法については、以下で詳細に説明する。上記のように、本発明の方法はヒトに適用できるだけでなく、他の動物にも同様に適用することが可能である。

【0244】

本発明の1つの実施形態の実施においては、哺乳動物患者が、神経、肺、心臓、卵巣または精巣への傷害といった副作用を一般に有する癌治療のための全身的な化学療法（放射線治療を含む）を受けている。上記のような組換え型組織保護サイトカインを含む医薬組成物の投与は、化学療法および/または放射線療法を行う前または行っている間に、化学療法剤による傷害から様々な組織および器官を保護するために（例えば、精巣を保護するために）実施される。治療は、化学療法剤の循環レベルが哺乳動物の身体に危険を及ぼす可能性のあるレベル以下に下がるまで続けることができる。

10

【0245】

本発明の他の実施形態の実施においては、複数の受容者に移植するために交通事故犠牲者から様々な器官を摘出することが計画され、これらの器官のうちの幾つかは長距離および長時間の輸送が必要であった。器官摘出の前に、本明細書に記載の組換え型組織保護サイトカインを含む医薬組成物を犠牲者に注入した。輸送用の摘出器官を、本明細書に記載の組換え型組織保護サイトカインを含む灌流液で灌流させ、組換え型組織保護サイトカインを含む浴の中に保存した。いくつかの器官は、本発明の組換え型組織保護サイトカインを含む灌流液を利用した拍動性灌流装置を用いて連続的に灌流した。輸送中、移植時、および *in situ*での器官の再灌流時の器官機能の劣化は最小限に食い止められた。

20

【0246】

本発明の他の実施形態においては、心臓弁を修復するための外科手術で、一時的な心停止および動脈閉塞が必要であった。外科手術前に、患者に体重1kgあたり4 μ gの組換え型組織保護サイトカインを注入した。このような処置は、特に再灌流後に、低酸素性虚血による細胞傷害を防止した。

【0247】

本発明の他の実施形態においては、任意の外科手術（例えば、心肺バイパス手術）において、本発明の組換え型組織保護サイトカインを用いることができる。1つの実施形態において、脳、心臓、および他の器官の機能を保護するために、上記組換え型組織保護サイトカインを含む医薬組成物の投与は、バイパス手術を行う前、行っている間、および/または行った後に行われる。

30

【0248】

本発明の組換え型組織保護サイトカインを *ex-vivo*用途で使用する場合において、または神経組織、網膜組織、心臓、肺、肝臓、腎臓、小腸、副腎皮質、副腎髄質、毛細管内皮、精巣、卵巣もしくは子宮内膜の細胞または組織のような応答性細胞を治療するために、本発明は、脈管構造の遠位にある応答性細胞、組織もしくは器官を保護または増強させるのに適した単位剤形としての医薬組成物を提供する。この医薬組成物は、剤形1つあたり、約0.01pg~5mg、1pg~5mg、500pg~5mg、1ng~5mg、500ng~5mg、1 μ g~5mg、500 μ g~5mg、または1mg~5mgの範囲の組換え型組織保護サイトカイン、および製薬上許容される担体を含む。好適な実施形態において、組換え型組織保護サイトカインの量は約1ng~5mgの範囲である。好適な実施形態において、上記組成物中の組換え型組織保護サイトカインは非赤血球産生性である。

40

【0249】

本発明のさらなる態様において、EPOの投与は、脳に外傷を負った動物の認知機能を回復させることが分かった。本発明の組換え型組織保護サイトカインはEPOと同様の細胞保護作用をもつことが期待される。5日または30日遅れた後でも、EPOはなお、擬似手術を行った動物と比較して機能を回復させることができた。これは、脳の活性を再生もしくは回復させるEPOの能力を示している。したがって、本発明は、脳の外傷または他の認知機能

50

障害の治療（損傷後、例えば3日後、5日後、1週間後、1ヶ月後またはそれ以上の治療も含む）のための医薬組成物を調製するための組換え型組織保護サイトカインの使用にも関する。また本発明は、有効量の組換え型組織保護サイトカインを投与することによる、損傷後の認知機能障害の治療方法にも関する。本発明のこの態様では、本明細書中に記載するどの組換え型組織保護サイトカインを使用してもよい。

【0250】

さらに、本発明のこの機能回復の態様は、治療がその機能障害の原因となる最初の傷害の後またはしばらくたった後に開始される場合の、細胞、組織もしくは器官の機能不全を回復させる医薬組成物を調製するための本明細書中に記載する組換え型組織保護サイトカインのいずれかの使用に関する。さらに、本発明の組換え型組織保護サイトカインを用いた治療は、急性期および慢性期の疾患または症状の過程を通して行うことができる。

10

【0251】

本発明の組換え型組織保護サイトカインが赤血球産生作用を有する場合は、好適な実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、一回の投与あたり、約0.01 pg~約100 μg/kg体重、好ましくは約1~50 μg/kg体重、最も好ましくは約5~30 μg/kg体重の用量で全身投与され得る。この有効用量は、組換え型組織保護サイトカインを投与した後に、組換え型組織保護サイトカインの血清レベルを血清1mlあたり約10,000、15,000または20,000 mUを超えるレベルとするために十分な量でなければならない。このような血清レベルは、投与後約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10時間経過後に達成されてもよい。このような投薬は必要に応じて繰り返すことができる。例えば投薬は、臨床的に必要であるかぎり、毎日繰り返してもよいし、適当な間隔をもうけて（例えば1週間~12週間毎、好ましくは1~3週間毎に）繰り返してもよい。1つの実施形態において、有効量の組換え型組織保護サイトカインおよび製薬上許容される担体を1回分用量のバイアルまたは他の容器の中にパッケージングすることができる。他の実施形態において、本明細書中に記載する目的に有用な組換え型組織保護サイトカインは非赤血球産生性であり、すなわち、ヘモグロビン濃度またはヘマトクリットの上昇を引き起こすことなく本明細書中に記載する活性を発揮することができる。このような非赤血球産生性形態の組換え型組織保護サイトカインは、本発明の方法を長期的に提供する場合に好適である。他の実施形態において、組換え型組織保護サイトカインは、赤血球産生を最大限に刺激するのに必要な量を超える量で与えられる。上記のように、本発明の組換え型組織保護サイトカインは、赤血球産生作用を必ずしももつ必要がないので、単位で表された上記用量は単に組換え型組織保護サイトカインの場合の例であり、本明細書では、どの組換え型組織保護サイトカインにも適用可能な投薬量について上記モル当量が提供される。

20

30

【0252】

本発明はさらに、上記の組換え型組織保護サイトカインに会合させた特定の分子を含む組成物を投与することによって、哺乳動物の体内の内皮細胞関門を越える分子の輸送を促進する方法に関する。上記のように、体内のいくつかの器官の内皮細胞同士の密着接合部は、ある種の分子の侵入を防ぐ障壁を形成している。障壁機能のある器官内の種々の症状を治療するためには、薬物の通過を促進する手段が望まれる。本発明の組換え型組織保護サイトカインは、血液脳関門や同様の関門を越えて他の分子を送達するための担体として有用である。組換え型組織保護サイトカインと共に関門を通過させたい分子を含む組成物を調製し、その組成物を末梢投与すると、関門を越える該組成物のトランスサイトーシスが生じる。関門を越えて輸送したい分子と組換え型組織保護サイトカインとの会合は、不安定な共有結合であってよく、この場合は、関門を通過した後該分子が組換え型組織保護サイトカインと会合した状態から解放される。該分子の所望の薬理活性が組換え型組織保護サイトカインとの会合により維持されるかまたは会合により影響を受けない場合、このような複合体を投与することができる。

40

【0253】

当業者であれば、分子を本発明の組換え型組織保護サイトカインおよび上記他の物質と共有結合、非共有結合および他の手段により会合させる様々な手段を思いつくことができ

50

るであろう。さらに、そのような組成物の効力の評価を実験系で簡単に決定することもできるであろう。組換え型組織保護サイトカインと分子との会合は、様々な手段（不安定な共有結合、架橋などを含む）によって行ってもよい。ビオチンとアビジンとの相互作用を用いることもできる。上記のように、組換えもしくは合成手段によって、例えばその分子の所望の薬理活性を有するドメインとエリスロポエチン受容体活性の調節を担うドメインの両方を含むハイブリッド分子を調製してもよい。

【0254】

多官能性分子（すなわち多官能性架橋剤）を介して分子を組換え型組織保護サイトカインに結合させることができる。本明細書中で用いる「多官能性分子」という用語は、連続して2回以上反応することができる1つの官能基を有する分子（ホルムアルデヒド等）および2つ以上の反応性基を有する分子を包含する。本明細書中で用いる「反応性基」という用語は、ある分子（例えば内皮細胞関門を越えて送達しようとするペプチド、タンパク質、炭水化物、核酸、特にホルモン、抗生物質、または抗癌剤）上の官能基と反応する架橋剤上の官能基であって、反応すると架橋剤と分子との間に共有結合を形成する官能基を指す。「官能基」という用語は、有機化学におけるその標準的な意味を持つ。使用することができる多官能性分子は、好ましくは生体適合性リンカーである（すなわち、これらは *in vivo* において非発癌性、非毒性であり、実質的に非免疫原性である）。当分野で公知であるものや本明細書中に記載するもの等の多官能性架橋剤は、これらの生体適合性を調べるために動物モデルで簡単にテストすることができる。多官能性分子は好ましくは二官能性である。本明細書中で用いる「二官能性分子」とは、2つの反応性基を有する分子を指す。二官能性分子は、ヘテロ二官能性であってもホモ二官能性であってもよい。ヘテロ二官能性架橋剤により、有向性結合（vectorial conjugation）が可能となる。架橋反応を水溶液（pH6~8に緩衝化した水溶液等）中で生じさせるには多官能性分子が十分な水溶性を有すること、また、より効果的な生体内分布を得るためには生じる結合体が水溶性のままであることが特に好ましい。典型的には、多官能性分子はアミノもしくはスルフヒドリル官能基と共有結合する。しかし、他の官能基（例えばカルボン酸またはヒドロキシル基）に対して反応性である多官能性分子も本発明において想定される。

【0255】

ホモ二官能性分子は少なくとも2つの同種の反応性官能基を有する。ホモ二官能性分子上の反応性官能基は、例えばアルデヒド基および活性エステル基を含む。アルデヒド基を有するホモ二官能性分子としては、例えばグルタルアルデヒドおよびスバルアルデヒド（subaraldehyde）が挙げられる。架橋剤としてのグルタルアルデヒドの使用は、Poznanskyら、*Science* 223, 1304-1306 (1984)により開示された。少なくとも2つの活性エステル単位を有するホモ二官能性分子としては、N-ヒドロキシスクシンイミドおよびジカルボン酸のエステルが挙げられる。このようなN-スクシンイミジルエステルの幾つかの例としては、ジスクシンイミジルスベレートおよびジチオ-ビス-（スクシンイミジルプロピオネート）、ならびにこれらの可溶性ビス-スルホン酸およびビススルホン酸塩（これらのナトリウム塩およびカリウム塩等）が挙げられる。これらのホモ二官能性試薬は、多くの販売元（Pierce, Rockford, Illinois）から入手可能である。

【0256】

ヘテロ二官能性分子は、少なくとも2つの異なる反応性基を有する。反応性基は異なる官能基（例えばエリスロポエチン突然変異タンパク質上および分子上に存在する）と反応する。ヘテロ二官能性架橋剤上の反応性基と反応するこれら2つの異なる官能基は通常、アミノ基（例えばリシンのアミノ基）、スルフヒドリル基（例えばシステインのチオール基）、カルボン酸（例えばアスパラギン酸のカルボキシレート）、またはヒドロキシル基（例えばセリンのヒドロキシル基）である。もちろん、本発明の組換え型組織保護サイトカインは、天然のエリスロポエチンの架橋を容易にする特定のアミノ酸残基を欠失していることもあるが、当業者であれば、本発明の突然変異タンパク質中の架橋に利用できる残基成分およびそれに応じた架橋について熟知しているだろう。

【0257】

さらに、本発明の種々の組換え型組織保護サイトカイン分子は、特定の架橋剤と共に使用する適当な反応性基をもたないかもしれない。しかし、当業者であれば、エリスロポエチン中の架橋に利用可能な基に基づいて架橋剤の選択を容易に行うことができるであろう。

【0258】

ヘテロ二官能性分子の反応性基がアミノ基と共有結合を形成するとき、この共有結合は通常はアミドもしくはイミド結合である。アミノ基と共有結合を形成する反応性基は、例えば活性化されたカルボキシレート基、ハロカルボニル基、またはエステル基であってもよい。好適なハロカルボニル基はクロロカルボニル基である。エステル基は好ましくは反応性エステル基であり、例えばN-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル基である。

10

【0259】

典型的には、他の官能基は、チオール基、チオール基に変換され得る基、またはチオール基と共有結合を形成する基である。共有結合は通常はチオエーテル結合またはジスルフィド結合である。チオール基と共有結合を形成する反応性基としては、例えば、活性化されたジスルフィドまたはチオール基と反応する二重結合が挙げられる。チオール基と反応することができる二重結合を含む反応性基はマレイミド基であるが、アクリロニトリル等の他の反応性基も可能である。反応性ジスルフィド基としては例えば2-ピリジルジチオまたは5,5'-ジチオ-ビス-(2-ニトロ安息香酸)基が挙げられる。反応性ジスルフィド結合を含むヘテロ二官能性試薬の幾つかの例としては、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (Carlssonら, 1978, Biochem J., 173:723-737)、S-4-スクシンイミジルオキシカルボニル-*m*-メチルベンジルチオ硫酸ナトリウム、および4-スクシンイミジルオキシカルボニル-*m*-メチル-(2-ピリジルジチオ)トルエンが挙げられる。N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネートが好ましい。チオール基と反応する二重結合を有する反応性基を含むヘテロ二官能性試薬の幾つかの例としては、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートおよびスクシンイミジル*m*-マレイミドベンゾエートが挙げられる。

20

【0260】

他のヘテロ二官能性分子としては、スクシンイミジル3-(マレイミド)プロピオネート、スルホスクシンイミジル4-(*p*-マレイミド-フェニル)ブチレート、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル-シクロヘキサン)-1-カルボキシレート、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステルが挙げられる。スクシンイミジル*m*-マレイミドベンゾエートのスルホン酸ナトリウム塩が好ましい。上記ヘテロ二官能性試薬およびこれらのスルホン酸塩の多くは、Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USAから入手可能である。

30

【0261】

可逆的または不安定な上記結合のために必要なことは、当業者により簡単に決定することができる。結合体を、*in vitro*にて組換え型組織保護サイトカイン活性および所望の薬理活性の両方についてテストすることができる。結合体がどちらの活性も維持している場合、次にその適合性について*in vivo*でテストする。結合された分子がその活性化のために組換え型組織保護サイトカインからの分離を必要とする場合は、組換え型組織保護サイトカインとの不安定な結合または可逆的な会合が好ましい。結合の不安定性についても、*in vivo*でテストする前に標準的な*in vitro*手法を用いて調べることができる。

40

【0262】

これらおよび他の多官能性試薬をどのように調製および使用するかについての更なる情報は、以下に挙げる出版物または当分野で入手可能な他の出版物から得ることができる：

1. Carlsson, J.ら, 1978, Biochem. J. 173:723-737
2. Cumber, J.A.ら, 1985, Methods in Enzymology 112:207-224
3. Jue, R.ら, 1978, Biochem 17:5399-5405
4. Sun, T.T.ら, 1974, Biochem 13:2334-2340
5. Blattler, W.A.ら, 1985, Biochem. 24:1517-152

50

6. Liu, F.T.ら, 1979, Biochem. 18:690-697
7. Youle, R.J.およびNeville, D.M., Jr., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:5483-5486
8. Lerner, R.A.ら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3403-3407
9. Jung, S.M.およびMoroi, M., 1983, Biochem. Biophys. Acta 761:162
10. Caulfield, M.P.ら, 1984, Biochem. 81:7772-7776
11. Staros, J.V., 1982, Biochem. 21:3950-3955
12. Yoshitake, S.ら, 1979, Eur. J. Biochem. 101:395-399
13. Yoshitake, S.ら, 1982, J. Biochem. 92:1413-1424
14. Pilch, P.F.およびCzech, M.P., 1979, J. Biol. Chem. 254:3375-3381
15. Novick, D.ら, 1987, J. Biol. Chem. 262:8483-8487
16. Lomant, A.J.およびFirbanks, G., 1976, J. Mol. Biol. 104:243-261
17. Hamada, H.およびTsuruo, T., 1987, Anal. Biochem. 160:483-488
18. Hashida, S.ら, 1984, J. Applied Biochem. 6:56-63

10

【0263】

さらに、架橋方法については、MeansおよびFeeney, 1990, Bioconjugate Chem. 1:2-12に概説されている。

【0264】

本発明の上記方法および組成物により越えられる関門としては、血液脳関門、血液眼関門、血液精巣関門、血液卵巣関門、血液心臓関門、血液腎臓関門、および血液子宮関門が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0265】

内皮細胞関門を越えて輸送させる候補分子としては、例えば、ホルモン（成長ホルモンなど）、神経栄養因子、抗生物質、抗ウイルス剤または抗真菌剤（例えば、脳や他の関門のある器官からは通常排除されるもの）、ペプチド放射性医薬品、アンチセンス薬、生物学的に活性な因子に対する抗体、医薬品、および抗癌剤が挙げられる。このような分子の非限定的な例としては、成長ホルモンなどのホルモン、神経成長因子（NGF）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、毛様体神経栄養因子（CNTF）、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）、トランスフォーミング増殖因子 1（TGF 1）、トランスフォーミング増殖因子 2（TGF 2）、トランスフォーミング増殖因子 3（TGF 3）、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン6、AZT、腫瘍壊死因子に対する抗体、およびシクロスポリン等の免疫抑制剤が挙げられる。さらに、診断目的で脳や他の関門のある器官内で細胞、組織もしくは器官を可視化するために、染料またはマーカーをエリスロポエチンまたは本発明の組織保護サイトカインの1つに結合させることができる。例として、患者におけるアルツハイマー病の進行を調べるために、脳内の斑点を可視化するのに用いられるマーカーをエリスロポエチンまたは組織保護サイトカインに結合させることが考えられる。

30

【0266】

また本発明は、内皮細胞の密着結合部の関門を越えるトランスサイトシスにより輸送させようとする分子と上記組換え型組織保護サイトカインとを含む組成物にも関する。本発明はさらに、上記のように関門を越えて分子を送達するための医薬組成物を調製するための、上記組換え型組織保護サイトカインと該分子との結合体の使用に関する。

40

【0267】

本発明は、本発明の例として提供される以下の非限定的実施例を参照することによってさらに良く理解することができる。以下の実施例は、本発明の好適な実施形態をよりあますところなく示すために提供される。ただしこれらの実施例は、本発明の広い範囲を限定するものと考えべきではない。

【実施例】

【0268】

6. 実施例

50

6.1. 実施例1: ヒト脳におけるエリスロポエチン受容体の分布

外科手術の際に摘出された正常なヒト脳（例えば、腫瘍切除術において腫瘍を含まない辺縁部を提供する）を、直ちに0.1Mリン酸バッファー（pH 7.4）中の5%アクロレインで3時間固定した。振動マイクロトームを用いて切片を厚さ40 μ mに切断した。浮遊切片および1:500希釈のエリスロポエチン受容体抗血清（Santa Cruz Biotechnologyより入手）を用いた間接抗体ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ法を用いて、免疫組織化学的染色を行った。内在性ペルオキシダーゼ活性は、組織切片の過酸化水素（メタノール中3%で30分間）による前処理によって消失させた。組織対照についても、一次抗体の省略および適切なブロッキングペプチド（Santa Cruz Biotech. より）の使用によって実施し、染色がエリスロポエチン（EPO）受容体に特異的であることを確認した。

10

【0269】

図1は、特異的な抗EPO受容体抗体を用いた免疫組織化学によって測定されるように、ヒト脳の毛細管が非常に高レベルのEPO受容体を発現することを示す。これは、血液脳関門にも関わらず、EPOが体循環から脳内に侵入できる機構を提供する。

【0270】

図2は、EPO受容体がヒト脳において血液脳関門を形成している毛細管内およびその周辺に高密度で局在化していることを示す。

【0271】

10 μ m切片をパラフィンから切り出して、包埋切片を4%パラホルムアルデヒドへの浸漬によって固定したこと以外は、図1および2と同様の方法を図3について行った。図3は、高密度のEPO受容体がヒト脳毛細管の管腔側および非管腔側の表面に存在し、循環系から脳内にEPOを輸送するための解剖学的基盤を形成していることを示す。

20

【0272】

図4は、組織を電子顕微鏡検査のために超マイクロトームで切片にしたこと、および二次抗体がコロイド金粒子で標識されたこと以外、図3と同様の方法に従って得られた。この図は、EPO受容体がヒト脳において内皮表面（*）、細胞質性小胞内（矢印）およびグリア突起上（+）に見られ、循環系から脳内にEPOを輸送するための解剖学的基盤を提供していることを示す。

【0273】

6.2. 実施例2: エリスロポエチンは血液脳脊髄液密着関門を越える

30

成体のオスSprague-Dawleyラットを麻酔し、5000 U/kg(体重)の組換えヒト・エリスロポエチンを腹腔内投与した。脳脊髄液を大槽から30分間隔で4時間までサンプリングし、エリスロポエチン濃度を高感度で特異的な酵素免疫測定法を用いて測定した。図5に示すように、CSF中の基底エリスロポエチン濃度は8 mU/mlである。数時間経過後、CSF中の測定エリスロポエチンレベルは上昇し始め、2.5時間以降まで $p < 0.01$ レベルで基底濃度と有意に異なる。約100 mU/mlのピークレベルは、*in vitro*で保護効果を発揮することが知られている範囲内（0.1~100 mU/ml）である。ピークまでの時間は約3.5時間で起こり、それは1時間未満で起こるピーク血清レベルより有意に遅延する。この実験の結果は、適切な濃度のエリスロポエチンのポラス非経口投与によって、有意なレベルのエリスロポエチンが細胞の密着結合を越えて到達し得ることを実証する。

40

【0274】

6.3. 実施例3: 組換え型組織保護サイトカイン

以下のヒト・エリスロポエチン構築物を以下の手順により作製した。ヒト・エリスロポエチンに対するcDNAは、ヒト脳cDNAからのPCRによって、公開されたヒトcDNA配列（登録番号NM_000799）に基づくプライマーを使用することによりクローニングした。プライマーは、Xho I部位をcDNAの5'末端に、Xba I部位を3'末端に導入するように設計した。プライマー配列は以下の通りである。すなわち、

HEPO-5-Xho I 5'-AGCTCTCGAGGCGCGGAGATGGGGGTGCACGAATG-3'（配列番号8）

HEPO-3-Xba I 5'-ATGCTCTAGACACACCTGGTCATCTGTCCCCTGTCC-3'（配列番号9）である。

【0275】

50

PCR産物をpCiNeo哺乳動物発現ベクター (Promega) のXho I部位とXba I部位の間にクローニングした。そのクローンの配列決定を行って、その配列が一塩基を除いてNM_000799の配列と一致することを確認した。コード配列中の塩基418 (ATGから番号付けを開始する) はGでなくCであり、最初のメチオニンから始まる全長EPO配列においてアミノ酸140をArgからGlyに変化させた。しかし、これは原型の配列からの標準的な配列変異であり、大部分の型のエリスロポエチンに出現する。

【0276】

エリスロポエチンcDNA由来のコード配列は、下記の通りである：

ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGCTCCCTCTGGGCCTCCCAGTCTGGG
CGCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGA 10
CGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG
ATGGAGGTCGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCTGTCTGCGGGGCCAGGCCCT
GTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCACTGCATGTGGATAAAGCCGTCAAGTGGCCTTCGCGAGCCTCACCCAC
TCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATCA
CTGCTGACACTTTCGCAAACCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCT
GCAGGACAGGGGACAGATGA (配列番号7)。

【0277】

このcDNAはエリスロポエチンの全長アミノ酸配列をコードし、それは下記の通りである：

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKR 20
MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALLGAQKEAISPPDAASAAPLRTI
TADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACRTGDR (配列番号10)。

【0278】

配列番号10の最初の27アミノ酸残基はリーダー配列を構成する。

【0279】

以下のオリゴヌクレオチドを用いて、6個のヒスチジンが全長配列中のAsp 192に結合されるように新しいオリゴヌクレオチドを設計することにより、6xHisタグをヒトEPOタンパク質のC末端に導入した。すなわち、

3'-6xhis- hEPO 5'-GGTCTAGATCAATGGTGATGGTGATGGTCCCCTGTCCTGCAGGCC-3' (配列番号134) である。 30

【0280】

EPO cDNAをHEPO-5-Xho Iオリゴおよび6xHisタグオリゴを用いたPCRによって増幅し、pCiNeo哺乳動物発現ベクターのXho I部位とXba I部位の間にクローニングした。インサートを再度配列決定し、その配列を確認した。

【0281】

5.2項において上述したヒトEPO cDNA配列 (C末端6xHisタグを有する) に対する突然変異は、本項に記載するオリゴヌクレオチドを用いたオリゴ指定突然変異誘発によって導入した。突然変異を確認するために突然変異体クローンを配列決定した。

【0282】

本発明の組換え型組織保護サイトカインを精製するためには多数の方法を使用することができ、それらには、ヒスチジntagを付けた本発明の組換え発現させた組織保護サイトカインと併せて使用される以下の方法が含まれるが、それらに限定されない。組換え細胞 (CHO-K1) 上清 (例えば、(Ni-CAM HC RESIN: High Capacity Nickel Chelate Affinity Matrix, Sigma, カタログ番号N 3158) からのレジン) を、緩やかな反転混和により十分に再懸濁した。その後、レジン懸濁液100 μ l (充填レジン50 μ lに相当) を微量遠心チューブ (1.7 mlサイズ) に添加した。この混合物を8,000 rpm、4 で5分間遠心分離し、レジンを沈殿させ、その後上清を廃棄した。微量遠心分離機はMegafuge 1.0R (Heraeus Instruments) であった。混合物を1 mlの脱イオン水で2回洗浄し (0.2 μ mフィルターでろ過)、エタノールを除去した。レジンを500 μ lの平衡化バッファー (50 mMリン酸ナトリウム、pH 8.0、0.3M NaCl、10mMイミダゾール) に再懸濁し、その後、その混合物を50 mlの 40 50

コニカルチューブに移した。微量遠心チューブを500 μ lの平衡化バッファーで洗浄し、その後この全量を50 mlのコニカルチューブ中の混合物に加えた。混合物を3,000 rpm、4で5分間遠心分離し、レジン沈殿させた。上清を除去し、廃棄した。サンプル (CHO-K1上清) を、結合の前に3,800 rpm、4で5分間遠心分離した。細胞上清をレジンを添加した。サンプル添加バッファー (50 mMリン酸ナトリウム、pH 8.0、3M NaCl、100mMイミダゾール) を1Xで添加し、回転プラットフォームにて4で1時間緩やかに混和した。使用したこのようなプラットフォームの一例は、Nutator (回転プラットフォーム) (Clay Adams Brand) である。混合物を3,000 rpm、4で5分間遠心分離した。上清を取り出し、SDS-PAGE解析およびELISA (非結合) のために保存した。レジン懸濁液を500 μ lの洗浄バッファーに再懸濁し、その後混合物を微量遠心チューブに移した。50 mlのコニカルチューブを500 μ lの平衡化バッファーで洗浄し、その後この全量を微量遠心チューブの混合物に加えた。レジン懸濁液をその後、回転プラットフォームにて10分間4で混和した。懸濁液を8,000 rpm、4で5分間遠心分離した (第一洗浄液をELISAのために保存してもよい)。レジン懸濁液を1 mlの洗浄バッファー中に再懸濁し、その後、レジン懸濁液を再度回転プラットフォームにて10分間4で混和し、もう一度レジン洗浄した。洗浄液は廃棄した。その後、75 μ lの溶出バッファー (50mMリン酸ナトリウム、pH 8.0、0.3M NaCl、500mMイミダゾール) を添加した。レジンを回転プラットフォームにて10分間4で混和した。混合物を8,000 rpm、4で5分間遠心分離した。上清を取り出し保存した。ヒスチジンタグを付けたタンパク質はこの画分にあった。より多くのタンパク質を溶出させるために、75 μ lの溶出バッファー (50mMリン酸ナトリウム、pH 8.0、0.3M NaCl、500mMイミダゾール) を再添加した。レジンを再度回転プラットフォームにて10分間4で混和した。混合物を再度8,000 rpm、4で5分間遠心分離した。溶出された画分を単一のプールまたは個別の画分として保存した。

【0283】

別法として、精製されたヒスチジンタグ付きサイトカインを単離するために以下の方法を使用した。馴化培地を回収し、0.45 μ mフィルターでろ過した。その後、50mlのアリコート、20 mMリン酸ナトリウム pH 7.4で平衡化し2.5 mlの100 mM NiSO₄で活性化した5ml HiTrap chelating (Amersham biosciences) にアプライした。カラムを20 mMリン酸ナトリウム pH 7.4で洗浄し、25カラム容量以上の20 mMリン酸ナトリウム pH 7.4中0 M ~ 0.5 M イミダゾールの勾配で溶出した。流速は5 ml/分、分画サイズは5 mlとした。

【0284】

組換え型組織保護サイトカインの存在について、画分をSDS-PAGEおよびEPO ELISAによって解析した。陽性画分をプールし、10 mM Tris pH 7.0に対して透析した。プールを、10 mM Tris pH 7.0で平衡化した1 ml HiTrap Q HP (Amersham biosciences) にアプライした。平衡化バッファーによる洗浄後、サンプルを10カラム容量以上の0.5MまでのNaCl勾配によって1 ml/分の流速で溶出した。1 mlの画分を回収し、SDS-PAGE、EPO ELISAおよびhexa-hisタグに対する抗体 (抗His₆、ROCHE) を用いたウェスタンブロットングにより解析した。組換え型組織保護サイトカインを含む画分をプールし、カットオフサイズ10kDaのセントリコン (Amicon) を用いて、1~2 mlの最終容量に濃縮した。

【0285】

組換え型組織保護サイトカインの最終的なプールを、SDS-PAGE (NuPage 4-12%; Invitrogen) によって解析し、製造メーカーの推奨するプロトコールによってNOVEX コロイダルブルー (Invitrogen) を用いて可視化した。組換え型組織保護サイトカインの純度は生じたゲルから判断した。グリコシル化組換え型組織保護サイトカインに対応する単一のバンドのみがゲルの各レーン中に存在し、これは単離されたサイトカインの高純度を示した。

【0286】

すべてのプラスミドはリポフェクタミンによってCHO-1細胞またはCOS-7細胞のいずれかにトランスフェクトされた。トランスフェクションの48~72時間後に細胞から培地を回収した。この培地をEPOについてELISAアッセイで検査し、直接または精製後、造血アッセイもしくは神経アッセイのいずれかに用いた。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 7 】

ヒトEPO cDNA配列に対する突然変異K45D、S100EおよびA30N/H32Tは、以下のオリゴヌクレオチドを用いたオリゴ指定突然変異誘発によって導入した。すなわち、

HEPO-S100E-upper 5'-CATGTGGATAAAGCCGTCGAGGGCCTTCGCAGCCTCACCCTCTG-3' (配列番号11)

HEPO-S100E-lower 5'-CAGAGTGGTGAGGCTGCGAAGGCCCTCGACGGCTTTATCCACATG-3' (配列番号12)

HEPO-K45D-upper 5'-GAGAATATCACTGTCCCAGACACCGACGTTAATTTCTATGCCTGG-3' (配列番号13)

HEPO-K45D-lower 5'-CCAGGCATAGAAATTAACGTCGGTGTCTGGGACAGTGATATTCTC-3' (配列番号14) 10

HEPO-A30N/H32T-upper 5'-GAATATCACGACGGGCTGTAATGAAACCTGCAGCTTGAATGAG-3' (配列番号132)

HEPO-A30N/H32T-lower 5'-CTCATTCAAGCTGCAGGTTTCATTACAGCCCGTCGTGATATTC-3' (配列番号133) である。

【 0 2 8 8 】

本発明の他のエリスロポエチン突然変異タンパク質および組換え型組織保護サイトカインのためのオリゴ指定突然変異誘発に使用されるオリゴヌクレオチド配列には、以下のものが含まれる。すなわち、

R150E突然変異タンパク質の場合 :

R150E-F GTCTACTCCAATTTCTCGAGGGAAAGCTGAAGCTG (配列番号120)

R150E-R GCTTCAGCTTTCCCTCGAGGAAATTGGAGTAGAC (配列番号121) 20

R103E突然変異タンパク質の場合 :

R103E-F CCGTCAGTGGCCTTGAGAGCCTCACCCTCTG (配列番号122)

R103E-R CAGAGTGGTGAGGCTCTCAAGGCCACTGACGG (配列番号123)

R103E/L108S(103)組合せ突然変異タンパク質の場合 :

R103E-F CCGTCAGTGGCCTTGAGAGCCTCACCCTCTG (配列番号124)

R103E-R CAGAGTGGTGAGGCTCTCAAGGCCACTGACGG (配列番号125) 30

L108S(103)F CGCAGCCTCACCCTTCGCTTCGGGCTCTGG (配列番号126)

L108S(103)R CCAGAGCCCGAAGCGAAGTGGTGAGGCTGCG (配列番号127)

44-49欠失の場合 :

d44-49F GAATATCACTGTCCCAGACGGTGGTGCCTGGAAGAGGATG (配列番号128)

d44-49R CATCCTCTCCAGGCACCACCGTCTGGGACAGTGATATTC (配列番号129)

K20A突然変異タンパク質の場合 :

K20A-F TACCTCTTGGAGGCCGCGGAGGCCGAGAATATC (配列番号130)

K20A-R GATATTCTCGCCTCCGCGCCTCCAAGAGGTA (配列番号131) 40

K140A突然変異タンパク質の場合 :

K140A-F GCTGACACTTTCCGCGCACTTCCGAGTCTACTC (配列番号132)

K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGTGACG (配列番号133)

K152A突然変異タンパク質の場合 :

K152A-F ATTTCTCCGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG (配列番号134)

K152A-R CTGTGTACAGCTTCAGCGCTCCCGGAGGAAAT (配列番号135)

K154A突然変異タンパク質の場合 :

50

K154A-F CTCCGGGGAAAGCTGGCGCTGTACACAGGGGA (配列番号 136)
 K154A-R TCCCCTGTGTACAGCGCCAGCTTTCCCCGGAG (配列番号 137)

K45A突然変異タンパク質の場合 :

K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG (配列番号 138)
 K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGTGTCTGGGACAGT (配列番号 139)

K52A突然変異タンパク質の場合 :

K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG (配列番号 140)
 K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCAGGCATAGAAATTAAGT (配列番号 141)

10

K97A突然変異タンパク質の場合 :

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC (配列番号 142)
 K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (配列番号 143)

K116A突然変異タンパク質の場合 :

K116A-F CTCTGGGAGCCCAGGCGGAAGCCATCTCCCCT (配列番号 144)
 K116A-R AGGGGAGATGGCTTCCGCCTGGGCTCCAGAG (配列番号 145)

K140A/K52A組合せ突然変異タンパク質の場合 :

20

K140A-F GCTGACACTTTCCGCGCACTCTTCCGAGTCTACTC (配列番号 146)
 K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGCAGC (配列番号 147)
 K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG (配列番号 148)
 K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCAGGCATAGAAATTAAGT (配列番号 149)

K140A/K52A/K45A組合せ突然変異タンパク質の場合 :

K140A-F GCTGACACTTTCCGCGCACTCTTCCGAGTCTACTC (配列番号 150)
 K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGCAGC (配列番号 151)
 K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG (配列番号 152)
 K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCAGGCATAGAAATTAAGT (配列番号 153)
 K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG (配列番号 154)
 K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGTGTCTGGGACAGT (配列番号 155)

30

K97A/K152A組合せ突然変異タンパク質の場合 :

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC (配列番号 156)
 K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (配列番号 157)
 K152A-F ATTTCCCTCCGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG (配列番号 158)
 K152A-R CTGTGTACAGCTTACAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (配列番号 159)

K97A/K152A/K45A組合せ突然変異タンパク質の場合 :

40

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC (配列番号 160)
 K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (配列番号 161)
 K152A-F ATTTCCCTCCGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG (配列番号 162)
 K152A-R CTGTGTACAGCTTACAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (配列番号 163)
 K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG (配列番号 164)
 K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGTGTCTGGGACAGT (配列番号 165)

K97A/K152A/K45A/K52A組合せ突然変異タンパク質の場合 :

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC (配列番号 166)
 K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (配列番号 167)

50

K152A-F ATTTCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG (配列番号 168)
 K152A-R CTGTGTACAGCTTCAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (配列番号 169)
 K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG (配列番号 170)
 K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGGTGTCTGGGACAGT (配列番号 171)
 K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG (配列番号 172)
 K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCAGGCATAGAAATTAAGT (配列番号 173)

K97A/K152A/K45A/K52A/K140A組合せ突然変異タンパク質の場合 :

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC (配列番号 174)
 K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (配列番号 175)
 K152A-F ATTTCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG (配列番号 176)
 K152A-R CTGTGTACAGCTTCAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (配列番号 177)
 K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG (配列番号 178)
 K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGGTGTCTGGGACAGT (配列番号 179)
 K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG (配列番号 180)
 K52A-R CGACCTCCATCCTCGCCAGGCATAGAAATTAAGT (配列番号 181)
 K140A-F GCTGACACTTTCCGCGCACTTTCCGAGTCTACTC (配列番号 182)
 K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGTACAGC (配列番号 183)

10

K97A/K152A/K45A/K52A/K140A/K154A組合せ突然変異タンパク質の場合 :

K97A-F TGCAGCTGCATGTGGATGCAGCCGTCAGTGGCC (配列番号 184)
 K97A-R GGCCACTGACGGCTGCATCCACATGCAGCTGCA (配列番号 185)
 K152A-F ATTTCTCCGGGGAGCGCTGAAGCTGTACACAG (配列番号 186)
 K152A-R CTGTGTACAGCTTCAGCGCTCCCCGGAGGAAAT (配列番号 187)
 K45A-F ACTGTCCCAGACACCGCAGTTAATTTCTATGCCTG (配列番号 188)
 K45A-R CAGGCATAGAAATTAAGTGCAGGTGTCTGGGACAGT (配列番号 189)
 K52A-F AGTTAATTTCTATGCCTGGGCGAGGATGGAGGTCG (配列番号 190)
 52A-R CGACCTCCATCCTCGCCAGGCATAGAAATTAAGT (配列番号 191)
 K140A-F GCTGACACTTTCCGCGCACTTTCCGAGTCTACTC (配列番号 192)
 K140A-R GAGTAGACTCGGAAGAGTGCGCGGAAAGTGTACAGC (配列番号 193)
 K154A(152)F CTCCGGGGAGCGCTGGCGCTGTACACAGGGGA (配列番号 194)
 154(152)R TCCCCTGTGTACAGCGCCAGCGCTCCCCGGAG (配列番号 195)

20

30

N24K/N38K/N83K組合せ突然変異タンパク質の場合 :

N24K-F CAAGGAGGCCGAGAAAATCACGACGGGCTGT (配列番号 196)
 N24K-R ACAGCCCGTCGTGATTTTCTCGGCCTCCTTG (配列番号 197)
 N38K-F ACTGCAGCTTGAATGAGAAAATCACTGTCCCAGACAC (配列番号 198)
 N38K-R GTGTCTGGGACAGTGATTTTCTCATTCAAGCTGCAGT (配列番号 199)
 N83K-F AGGCCCTGTTGGTCAAATCTTCCCAGCCGTG (配列番号 200)
 N83K-R CACGGCTGGGAAGATTTGACCAACAGGGCCT (配列番号 201)

40

K152W突然変異タンパク質の場合 :

K152W-F ATTTCTCCGGGGATGGCTGAAGCTGTACACAG (配列番号 202)
 K152W-R CTGTGTACAGCTTCAGCCATCCCCGGAGGAAAT (配列番号 203)

R14A/Y15A組合せ突然変異タンパク質の場合 :

RY14AA-F AGCCGAGTCCTGGAGGCGGCCCTCTTGAGGGCAA (配列番号 204)
 RY14AA-R TTGGCCTCCAAGAGGGCCGCTCCAGGACTCGGCT (配列番号 205)
 Y15A-F AGCCGAGTCCTGGAGGCGGCCCTCTTGAGGGCAA (配列番号 206)
 Y15A-R TTGGCCTCCAAGAGGGCCCTCTCCAGGACTCGGCT (配列番号 207)

50

【0289】

以下は、作製された構築物の例である。すなわち、ヒトEPO(hEPO)-6xHisTag-pCiNeo配列(配列番号208); hEPO6xHisTag-A30N/H32T pCiNeo(配列番号209); hEPO-6xHisTag-K45D-pCiNeo配列(配列番号210); hEPO-6xHisTag-S100E-pCiNeo配列(配列番号211); およびhEPO-6xHisTag-K45D/S100E-pCiNeo配列(配列番号212)。pCI-neo哺乳動物発現ベクターは、哺乳動物細胞においてクローニングしたDNAインサートの構成的発現を促進するために、ヒト・サイトメガロウイルス(CMV)前初期エンハンサー/プロモーター領域を有する。

【0290】

突然変異を導入するために、これらのオリゴヌクレオチドをpCiNeo中の原型のヒト・エリスロポエチンcDNAクローンにアニーリングした。突然変異体クローンを配列決定し、その突然変異を確認した。すべてのプラスミドはリポフェクタミンによってCHO-1細胞またはCOS-7細胞のいずれかにトランスフェクトされた。トランスフェクションの48~72時間後に細胞から培地を回収した。この培地をエリスロポエチンについてELISAアッセイで検査し、直接または精製後、造血アッセイもしくは神経アッセイのいずれかに用いた。

【0291】

その後、K45DおよびS100E組換え型組織保護サイトカインの両方を神経アッセイで検査した。特に、SK-N-SH神経芽腫細胞を用いるin vitro神経保護アッセイを使用した。SK-N-SH細胞を40,000個/ウェルの密度で24ウェルプレートに播種し、24時間培養した。その後、組換え型組織保護サイトカインを3 nMの濃度で添加し、更に24時間培養した(エリスロポエチン=市販製剤; EPO=CHO細胞で発現させたエリスロポエチンおよび組換え型組織保護サイトカイン; 純粋ベクター=Epo構築物を含まないベクターでトランスフェクトしたCHO細胞由来の細胞上清)。この前培養の後、細胞をロテノン(5 μM)に4時間曝露し、洗浄し、回収のために24時間静置した。示したEPO変異体は、これらすべてのステップの間中存在した。細胞の生存能は、実験の最後に、細胞をテトラゾリウム色素WST-1(製造メーカーの使用説明書に従う: Roche # 1644807)とともに2時間培養することによって定量し、生存能を吸光度の読取り値として示した。

【0292】

図6Aおよび6Bは、エリスロポエチンならびにK45DおよびS100E組換え型組織保護サイトカインを含む組換え型組織保護サイトカインについて、SK-N-SH神経芽腫細胞での(ロテノンに対する)神経保護アッセイの結果を示す。図6Aのグラフは、K45DおよびS100Eサンプル内の細胞の生存能が維持されることを明らかに示しており、それらの生存能はそれらの細胞保護作用を実証した。図6Bは、hEPO-6xHisTag-PCiNeoのプラスミド地図を示す。

【0293】

6.4. 実施例4: 組織保護サイトカイン

本明細書に記載する使用に望ましい組換え型組織保護サイトカインは、とりわけ、脱シアル化、グアニジン化、カルバミル化、アミジン化、トリニトロフェニル化、アセチル化、スクシニル化、ニトロ化、または、アルギニン残基もしくはカルボキシル基の修飾によって、更に修飾されうる。あるいは、これらの修飾は、組換え型組織保護サイトカインへのその突然変異に先立って、天然のエリスロポエチンまたはエリスロポエチンの誘導体(脱シアル化、グアニジン化、カルバミル化、アミジン化、トリニトロフェニル化、アセチル化、スクシニル化、もしくはニトロ化されたエリスロポエチンを含むが、それらに限定されない)に対して行うことができる。組換え型組織保護サイトカインの更なる修飾のいくつかの例を以下に記載する。当業者は、下記の方法がまた、天然のエリスロポエチンまたはその誘導体を化学的に修飾するために、組換え型組織保護サイトカインを生成する突然変異の導入に先立って使用されうることを理解するであろう。

【0294】

6.4.1. 組換え型組織保護サイトカインの脱シアル化

組換え型組織保護サイトカインは、以下の例示的な方法によって脱シアル化されうる。

10

20

30

40

50

シアリダーゼ (Streptococcus sp 6646Kから単離したもの) は、SEIKAGAKU AMERICA (コード番号120050) から入手する。組換え型組織保護サイトカインを、シアリダーゼ (0.025 U/mg EPO) によって37 で3時間脱シアル化に供する。反応混合液をUltrafree Centrifugal Filter Unitによって脱塩および濃縮する。サンプルをAKTAprime (商標) システムのイオン交換カラムにアプライする。タンパク質を所定のバッファーで溶出する。有意な量のタンパク質を含む溶出画分のIEFゲル解析を行う。上端の2つのバンド (IEFゲル上でpI約8.5および約7.9に移動する) のみを含む画分をプールする。タンパク質含量を測定し、1/9容の10 x塩溶液 (1 M NaCl、0.2 Mクエン酸ナトリウム、3 mMクエン酸) を添加する。シアル酸含量を測定する。有意なシアル酸含量は検出されない。

【0295】

アシアロエリスロポエチンは、図7~8に示すように *in vitro* において神経細胞に対し、天然のエリスロポエチンと同様に有効であった。*in vitro* での検査は、血清の除去によってアポトーシスを受ける神経様胎生期癌細胞 (P19) を用いて実施した。血清除去の24時間前に、1~1000 ng/mlのエリスロポエチンまたは修飾エリスロポエチンを培養液に添加した。その翌日、培地を除去し、細胞を新しい無血清培地で洗浄し、試験物質を含む培地 (無血清) を培養物に再添加し、更に48時間培養した。生細胞数を測定するために、テトラゾリウム還元アッセイを行った (CellTiter 96; Promega, Inc.)。図7~8に示すように、アシアロエリスロポエチンは、細胞死の抑制においてエリスロポエチンと同等の効力をもつようである。

【0296】

in vivo での神経保護活性の保有は、以前に記載されたように (Brinesら、2000, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 97:10526-31) 中大脳動脈の領域への可逆的な損傷を与えたラット限局性虚血モデルを用いて確認した。動脈閉塞の発症時に、成体のオスSprague-Dawleyラットに、アシアロエリスロポエチンもしくはエリスロポエチン (腹腔内に5000 U/kg体重) またはビヒクルを投与した。24時間後、動物を屠殺し、それらの脳を研究のために摘出した。連続切片を切り、テトラゾリウム塩で染色して、生存している脳の領域を同定した。図9に示されるように、アシアロエリスロポエチンは神経保護を提供する上で天然のエリスロポエチンと同等に効果的であり、すなわち、虚血の1時間から梗塞体積を減少させた。図10は、エリスロポエチンおよびアシアロエリスロポエチンで比較用量反応試験を行った、別の限局性虚血モデルの結果を示す。4 μg/kgの最低用量において、アシアロエリスロポエチンは保護するが、非修飾エリスロポエチンは保護できなかった。各群のラット数 (n) は4匹以上とした。

【0297】

同様の結果は、本発明のアシアロ組換え型組織保護サイトカインから期待されるであろう。

【0298】

6.4.2. 組換え型組織保護サイトカインのカルバミル化

組換え型組織保護サイトカインは、Jin Zeng (1991) (Lysine modification of metallothionein by carbamylation and guanidination. Methods in Enzymology 205: 433-437) に記載されるように、以下の方法に従って、それぞれのカルバミル化分子を調製するために使用される。シアン酸カリウムを再結晶させる。1 Mのホウ酸バッファー (pH 8.8) を調製する。組換え型組織保護サイトカイン溶液を等量のホウ酸バッファーと混合する。シアン酸カリウムを反応チューブに最終濃度0.5 Mになるように直接添加する。よく混和し、37 で6~16時間インキュベートする。十分に透析する。透析チューブから生成物を取り出し、新しいチューブに回収する。体積を測定し、1/9容の10 X塩溶液 (1 M NaCl、0.2 Mクエン酸ナトリウム、3 mMクエン酸) を添加する。タンパク質含量を測定し、生成物の回収率を計算する。生成物をIEFゲルによって解析し、続いてTF-1細胞を用いた *in vitro* 検査を行う。

【0299】

6.4.3. 組換え型組織保護サイトカインのスクシニル化

10

20

30

40

50

組換え型組織保護サイトカインは、Alcaldeら (2001) (Succinylation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. 501 enhances its transferase activity using starch as donor. *J. Biotechnology* 86: 71-80) に記載されるように、以下の方法に従って、それぞれのスクシニル化分子を調製するために使用されうる。0.5 M NaHCO₃ (pH 8.0) 中の組換え型組織保護サイトカイン (100 μg) を、15モル過剰の無水コハク酸とともに15 で1時間インキュベートした。蒸留水での透析によって、反応を停止させた。

【0300】

無水コハク酸を無水アセトンに27 mg/mlで溶解させる。エッペンドルフチューブ中の10 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) で反応を行う。組換え型組織保護サイトカインタンパク質および50倍モル濃度の無水コハク酸をチューブに添加する。よく混和し、4 で1時間チューブを回転させる。透析カセット (Slide-A-Laze 7K, Pierce 66373) を用いて、10 mMリン酸ナトリウムバッファーでの透析によって反応を停止させる。透析カセットから生成物を取り出し、新しいチューブに回収する。体積を測定し、1/9容の10 X塩溶液 (1 M NaCl, 0.2 Mクエン酸ナトリウム、3 mMクエン酸) を添加する。タンパク質含量を測定し、生成物の回収率を計算する。生成物をIEFゲルによって解析し、続いてTF-1細胞を用いた *in vitro* 検査を行う。

10

【0301】

6.4.4. 組換え型組織保護サイトカインのアセチル化

組換え型組織保護サイトカインは、Satakeら (1990) (Chemical modification of erythropoietin: an increase in *in-vitro* activity by guanidination. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1038: 125-129) に記載されるように、以下の方法に従って、それぞれのアセチル化分子を調製するために使用されうる。

20

【0302】

エッペンドルフチューブ中の80 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.2) で反応を行う。組換え型組織保護サイトカインおよび等モル濃度の無水酢酸を添加する。よく混和し、氷上で1時間インキュベートする。透析カセット (Slide-A-Laze 7K, Pierce 66373) を用いて、水での透析によって反応を停止させる。透析カセットから生成物を取り出し、新しいチューブに回収する。体積を測定し、1/9容の10 X塩溶液 (1 M NaCl, 0.2 Mクエン酸ナトリウム、3 mMクエン酸) を添加する。タンパク質含量を測定し、生成物の回収率を計算する。生成物をIEFゲルによって解析し、続いてTF-1細胞を用いた *in vitro* 検査を行う。

30

【0303】

6.4.5. 組換え型組織保護サイトカインのリシンのカルボキシメチル化

組換え型組織保護サイトカインは、Akhtarら (1999) Conformational study of N⁻(carboxymethyl)lysine adducts of recombinant α-crystallins. *Current Eye Research*, 18: 270-276に記載されるように、以下の方法に従って、組換え型組織保護サイトカインの1個以上のリシル残基が修飾された、それぞれのN⁻(カルボキシメチル)リシン (CML) 修飾分子を調製するために使用されうる。

【0304】

リン酸ナトリウムバッファー (50 mM, pH 7.5) 中に200 mMグリオキシル酸および120 mM NaBH₃CNを新たに調製する。エッペンドルフチューブに (リン酸バッファー中の) 組換え型組織保護サイトカインを添加し、溶液中のリシン当量を計算する (約8リシル残基/cm¹)。3倍多いNaBH₃CNおよび5または10倍多いグリオキシル酸をチューブへ添加する。各チューブをボルテックス混合し、37 で5時間インキュベートする。サンプルをリン酸バッファーで一晩4 で透析する。透析後、各生成物の体積を測定する。タンパク質濃度を測定し、生成物の回収率を計算する。生成物をIEFゲルによって解析し、続いてTF-1細胞を用いた *in vitro* 検査を行う。

40

【0305】

6.4.6. 組換え型組織保護サイトカインのヨウ素化

50

組換え型組織保護サイトカインは、Pierce Chemical Company (Rockford, IL) によって提供される IODO-Gen Pre-Coated Iodination Tubes (製品番号 28601) の説明書に記載されるように、以下の方法に従って、それぞれのヨウ素化分子を調製するために使用される。

【0306】

0.1 M NaI を調製し、IODO-Gen Pre-Coated Iodination Tube (Pierce, 28601) において 0.1 ml/チューブの全反応容量を用いて、リン酸ナトリウムバッファー (40 mM、pH 7.4) 中でヨウ素化を行う。タンパク質基質 (組換え型組織保護サイトカイン) をリン酸ナトリウムバッファーと混合し、その後、IODO-Gen Pre-Coated Iodination Tube に移す。最終濃度 1~2 mM になるよう NaI を添加し、NaI/タンパク質のモル比を 14~20 にする。よく混和し、室温で 15 分間緩やかに振とうしながらインキュベートする。反応混合物を取り出すことによって反応を停止させ、3.9 ml のナトリウムバッファーを含むチューブに添加する (すなわち、40 倍希釈)。生成物を、あらかじめ湿らせた Ultrafree Centrifugal Filter Unit によって濃縮する。濃縮物の体積を測定し、1/9 容の 10 X 塩溶液 (1 M NaCl、0.2 M クエン酸ナトリウム、3 mM クエン酸) を添加する。タンパク質濃度を測定し、生成物の回収率を計算する。生成物を IEF ゲルによって解析し、続いて TF-1 細胞を用いた *in vitro* 検査を行う。

10

【0307】

別法として、組換え型組織保護サイトカインは、以下の方法を用いてヨウ素化してもよい。Iodo Bead (Pierce, Rockford, IL) を 1 mCi 遊離 Na^{125}I を含む 100 μl PBS (20 mM リン酸ナトリウム、0.15 M NaCl、pH 7.5) 中で 5 分間インキュベートした。その後、100 μl PBS 中の 100 μg の組換え型組織保護サイトカインを混合物に添加した。室温で 10 分間のインキュベーション後、200 μl の溶液を反応容器から取り出すことによって反応を停止させた (iodo bead は後に残す)。過剰なヨウ素をセントリコン 10 カラムでのゲルろ過によって除去した。図 1-1 に示すように、この方法で得られたヨードエリスロポエチンは、血清除去から P19 細胞を保護するのに有効である。当業者は、本発明の組換え型組織保護サイトカインのヨウ素化から同様の結果が期待されることを認識するであろう。

20

【0308】

組換え型組織保護サイトカインをヨウ素化する更に別の方法を以下に概説する。100 μl PBS 中の 100 μg の組換え型組織保護サイトカインを 500 μCi Na^{125}I に添加し、エップンドルフチューブ中とともに混合した。その後、25 μl のクロラミン T (2 mg/ml) を添加し、混合物を 1 分間室温でインキュベートした。その後、50 μl のクロラミン T 停止バッファー (PBS 中 2.4 mg/ml メタ重亜硫酸ナトリウム、10 mg/ml チロシン、10% グリセロール、0.1% キシレン) を添加した。ヨードチロシンおよびヨウ素化組換え型組織保護サイトカインはその後、セントリコン 10 カラムでのゲルろ過によって分離した。

30

【0309】

6.4.7. 組換え型組織保護サイトカインのビオチン化

組換え型組織保護サイトカインは、Pierce Chemical Company (Rockford, IL) によって提供される EZ-Link NHS-LC-Biotin (製品番号 21336) の説明書に記載されるように、以下の方法に従って、それぞれのビオチン化分子を調製するために使用される。

40

【0310】

反応の直前に、EZ-Link NHS-LC Biotin (Pierce, 21336) を DMSO で 2 mg/ml に溶解する。チューブ (17 x 100 mm) 中で、50 mM 炭酸水素ナトリウム (pH 8.3) を含む全量 1 ml で反応を行う。組換え型組織保護サイトカインおよび 10% 未満の EZ-Link NHS-LC-Biotin を、約 20 のビオチン/タンパク質のモル比で添加する。よく混和し、氷上で 2 時間インキュベートする。Ultrafree Centrifugal Filter Unit によって反応生成物を脱塩し、濃縮する。生成物を新しいチューブに回収する。体積を測定し、1/9 容の 10 X 塩溶液 (1 M NaCl、0.2 M クエン酸ナトリウム、3 mM クエン酸) を添加する。タンパク質含量を測定し、生成物の回収率を計算する。生成物を IEF ゲルによって解析し、続いて TF-1 細胞を用いた *in vitro* 検査を行う。

50

【0311】

組換え型組織保護サイトカインの遊離アミノ基をビオチン化する方法を、以下に記載する。0.2 mgのD-ビオチノイル-e-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Boehringer Mannheim #1418165) を100 μ l DMSOに溶解した。この溶液を、ホイルで覆ったチューブの中で約0.2 mgの組換え型組織保護サイトカインを含む400 μ l PBSと合わせた。4時間室温でインキュベートした後、未反応のビオチンをセントリコン10カラムでのゲルろ過によって分離した。図12に示すように、このビオチン化エリスロポエチンはP19細胞を血清除去から保護する。当業者は、本発明の組換え型組織保護サイトカインのビオチン化から同様の結果が期待されることを認識するであろう。

【0312】

最後に、WojchowskiらBlood, 1989, 74(3):952-8による"Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand"において、著者らは、エリスロポエチンをビオチン化する3つの異なる方法を使用している。ビオチンは(1)シアル酸成分、(2)カルボン酸基、および(3)アミノ基に付加される。著者らは、マウス脾細胞増殖アッセイを使用して、以下のことを実証している。すなわち、(1)ビオチンのシアル酸成分への付加は、エリスロポエチンの生物学的活性を不活性化しない。(2)ビオチンのカルボン酸基への付加は、エリスロポエチンの実質的な生物学的不活性化を招いた。(3)ビオチンのアミノ基への付加は、エリスロポエチンの完全な生物学的不活性化をもたらした。これらの方法および修飾は、本明細書に完全に包含される。図12は、血清飢餓P19アッセイにおける、ビオチン化エリスロポエチンおよびアシアロエリスロポエチンの活性を示す。当業者は、本発明の組換え型組織保護サイトカインのビオチン化から同様の結果が期待されることを認識するであろう。6.15項を参照されたい。

【0313】

6.5. 実施例5: 他の方法による組換え型組織保護サイトカインの修飾

6.5.1. トリニトロフェニル化

組換え型組織保護サイトカイン(100 μ g)は、Plappら("Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups" 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-945)に記載されるように、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸によって修飾された。

【0314】

6.5.2. アルギニンの修飾

組換え型組織保護サイトカインは、Riordan("Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione" Riordan JF, Biochemistry 1973, 12(20): 3915-3923)に記載されるように、2,3ブタンジオンによって修飾された。

【0315】

エリスロポエチンのアミノ酸残基を修飾する別の修飾では、フェニルグリオキサールを用いて、室温で0.5~3時間の範囲の様々な時間で行われるTakahashi(1977, J. Biochem. 81:395-402)の方法に従って、アルギニン残基を修飾した。反応混合物を水で透析することによって、反応を終了させた。このような修飾型のエリスロポエチンの使用は、本明細書に完全に包含される。フェニルグリオキサールで修飾されたエリスロポエチンは、上述の神経様P19細胞アッセイを用いて検査した。図13に示すように、この化学的に修飾されたエリスロポエチンは、その神経保護効果を完全に保持している。同様の結果は、同様に修飾された本発明の組換え型組織保護サイトカインからも得られる。

【0316】

組換え型組織保護サイトカインは、Patthyら("Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme" Patthy, L, Smith EL, J. Biol. Chem 1975 250(2): 565-9)の場合のように、シクロヘキサノンによって修飾された。

【0317】

組換え型組織保護サイトカインは、Werberら("Proceedings: Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues" Werber, MM, Sokolovsky M Isr J Med Sc

10

20

30

40

50

i 1975 11(11): 1169-70)に記載されるように、フェニルグリオキサールによって修飾された。

【0318】

6.5.3. チロシンの修飾

組換え型組織保護サイトカイン(100 μ g)を、以前にNestlerら("Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane" Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd. J Biol Chem 1985 Jun 25;260(12):7316-21)に記載されたように、テトラニトロメタンとともにインキュベートした。

【0319】

6.5.4. グルタミン酸(およびアスパラギン酸)の修飾

カルボキシル基を修飾するために、組換え型組織保護サイトカイン(100 μ g)を、Carrawayら"Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen." Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE Jr. J Mol Biol 1969 May 28;42(1):133-7に記載されたように、pH 4.5で1 Mグリシンアミド中で0.02 M EDCとともに室温で60分間インキュベートした。

【0320】

6.5.5. トリプトファン残基の修飾

組換え型組織保護サイトカイン(100 μ g)を、Aliら、J Biol Chem. 1995 Mar 3;270(9):4570-4に記載されたように、20 mMのリン酸カリウムバッファー(pH 6.5)中で20 μ M n-プロモスクシニミドとともに室温でインキュベートした。酸化されたトリプトファン残基の数は、Korotchkina (Korotchkina, LGら Protein Expr Purif. 1995 Feb;6(1):79-90)に記載される方法によって決定された。

【0321】

6.5.6. アミノ基の除去

組換え型組織保護サイトカインのアミノ基を除去するために、Kokkiniら(Kokkini, G., ら"Modification of hemoglobin by ninhydrin" Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705)の場合のように、100 μ gを、20 mMニンヒドリン(Pierce Chemical, Rockford, IL)を含むPBS(pH 7.4)中で、2時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。その結果生じるアルデヒドの還元は、生成物を水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化アルミニウムリチウムと反応させることによって達成された。具体的には、エリスロポエチン(100 μ g)をPBS中の0.1 M水素化ホウ素ナトリウムとともに30分間室温でインキュベートした。氷上で10分間サンプルを冷却し、それをPBSで3回、一晩かけて透析することによって、還元を終了させた(Kokkini, G., Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705)。水素化アルミニウムリチウムを用いた還元は、組換え型組織保護サイトカイン(100 μ g)をPBS中の0.1 M水素化アルミニウムリチウムとともに30分間室温でインキュベートすることによって行った。氷上で10分間サンプルを冷却し、それをPBSで3回、一晩かけて透析することによって、還元を終了させた。

【0322】

6.5.7. ジスルフィドの還元および安定化

組換え型組織保護サイトカイン(100 μ g)を500 mM DTTとともに15分間60 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。その後、20 mMヨードアセトアミド水溶液を混合物に添加し、25分間室温で暗所においてインキュベートした。

【0323】

6.5.8. 制限されたタンパク質加水分解

組換え型組織保護サイトカインは、特定の残基を標的とする限定的な化学的タンパク質加水分解に供することができる。組換え型組織保護サイトカインは2-(2-ニトロフェニルスルフェニル)-3-メチル-3'-プロモインドレニンと反応させることができ、これは、50%酢酸中50倍過剰で48時間暗所、室温で、窒素圧力下においてキャップをしたチューブ中で、トリプトファン残基の後ろを特異的に切断する。反応は、トリプトファンによって抑制され、脱塩することによって終了された。

10

20

30

40

50

【0324】

上述のように、組換え型組織保護サイトカインは修飾されてもよく、更に、本発明の精神から逸脱することなく、組織保護サイトカイン分子の複数の修飾ならびに更なる修飾もまた行われうる。

【0325】

6.6. 組織保護サイトカインは神経保護作用を有する

化学的に修飾されたエリスロポエチンの神経保護作用は、Manleyら、2000, Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke, Nat Med 2000 Feb;6(2):159-63に従って、水中毒アッセイを用いて評価された。メスC3H/HENマウスを使用した。マウスにそれらの体重の20%の水をIPで400 ng/kg体重のDDAVP (デスモプレシン) とともに投与した。マウスにエリスロポエチン (A)、または組織保護サイトカイン、すなわち、アシアロエリスロポエチン (B)、カルバミル化アシアロエリスロポエチン (C)、スクシニル化アシアロエリスロポエチン (D)、アセチル化アシアロエリスロポエチン (E)、ヨウ素化アシアロエリスロポエチン (F)、カルボキシメチル化アシアロエリスロポエチン (G)、カルバミル化エリスロポエチン (H)、アセチル化エリスロポエチン (I)、ヨウ素化エリスロポエチン (J)、もしくはN-カルボキシメチルエリスロポエチン (K) を投与した。マウスに100 µg/kg用量のエリスロポエチンまたは化学的に修飾されたエリスロポエチンを、水投与の24時間前および水投与時にも腹腔内に投与した。マウスを評価するために、Manleyらから改変されたスケールを使用した。改変したスケールは以下に記載された通りである。すなわち、

ケージ/テーブルの探索

する	0
しない	1

物体の視覚的追跡

する	0
しない	1

ひげの動き

有り	0
無し	1

下肢・尾の動き

正常	0
硬直	1
麻痺	2

痛覚からの引っ込み反射 (つま先つまみ)

有り	0
無し	1

運動の協調

正常	0
異常	1

テーブルの縁での停止

する	0
しない	1

総スコアは8となり得る。

【0326】

以下の時点、すなわち、15、30、45、60、75、90、120、150、および180分でマウスのスコアを取った。図14は、エリスロポエチンまたは化学的に修飾されたエリスロポエチンを投与されたマウスの成績を、対照マウスが経験した神経欠陥に対するパーセントとしてプロットする。図14は、組織保護サイトカインが水中毒によって誘導される神経の外傷からマウスを保護することを示す。同様の結果は同様の化学的修飾を有する組換え型組織保護サイトカインから期待されるであろう。統計的有意性もまた決定された。対照と比

較して $p < 0.05$ の有意差を伴う投与計画は*で示されるが、より高い $p < 0.01$ の有意差を伴うものは**によって示される。

【0327】

6.7. 実施例7: 移植のために用意した心臓の機能維持

体重300~330gのオスWistarラットは、Delcayreら、1992, Amer. J. Physiol. 263:H15 37-45の方法に従って行ったex vivo研究のために、心臓を摘出する24時間前に、エリスロポエチン(5000 U/kg体重)またはビヒクルを投与した。動物をペントバルビタール(0.3 mL)で屠殺し、静脈内にヘパリン(0.2mL)を投与した。心臓を最初に15分間平衡化させる。その後、左心室バルーンを8 mm Hgの拡張末期圧を与える体積に膨らませる。左心室圧力体積曲線は0.02 mlずつバルーン体積を漸次膨張させることによって作成する。ゼロ体積は、左心室拡張末期圧がゼロの点として定義される。圧力体積曲線が完成したら、左心室バルーンを収縮させて8 mm Hgの拡張末期圧に戻し、冠状血流の確認後、15分間のコントロール期間をもうける。その後、心臓を50 mL Celsior液+分子で停止させ、4で60cm H₂Oの圧力下で静置した。その後、心臓を摘出し、同溶液を満たし周囲を砕氷で囲んだプラスチック容器内に4で5時間保存した。

10

【0328】

保存終了後、心臓をランゲンドルフ装置に移す。バルーンカテーテルを左心室に再挿入し、虚血前の期間と同様の体積に再膨張させる。心臓を少なくとも2時間37で再灌流する。再灌流圧を、再灌流の15分間は50 cm H₂Oに設定し、その後、次の2時間は100 cm H₂Oに戻す。ペーシング(毎分320拍)を再開する。収縮指数および拡張期圧の定積測定は、再灌流の25、45、60、および120分に3回反復で行った。この時点で、圧力体積曲線を作成し、再灌流45分間の冠状動脈流出液をクレアチンキナーゼ漏出を測定するために回収する。2つの処理群を対応なしのt検定により比較し、拡張末期圧データを用いた線形回帰はコンプライアンス曲線を作図するために使用される。図15に示すように、発達した左心室圧の有意な改善がエリスロポエチンでの処理後に起こり、同様に、圧力体積曲線の改善、左心室拡張期圧の減少、およびクレアチンキナーゼ漏出の減少が起こる。同様の結果が本発明の組換え型組織保護サイトカインによる処理からも期待される。

20

【0329】

6.8. 実施例8: エリスロポエチンは虚血性障害から心筋を保護する

24時間前に組換えヒト・エリスロポエチン(5000 U/kg体重)を投与された成体オスのラットを麻酔し、冠状動脈閉塞のために用意した。更なる用量のエリスロポエチンを処置の初めに投与し、左冠状動脈を30分間閉塞させ、その後解放した。同量のエリスロポエチンを処置後1週間毎日投与した。その後、動物の心機能について研究した。図16に示すように、偽注射(生理食塩水)を受けた動物は、左心室拡張末期圧の大幅な上昇、心筋梗塞による二次的な心臓肥大、硬化の特徴を示した。対照的に、エリスロポエチンを注射された動物は、偽処置された対照と比較して心機能の低下を受けなかった($p < 0.01$ のレベルで有意差を示した)。同様の結果が本発明の組換え型組織保護サイトカインによる処理からも期待される。

30

【0330】

6.9. 実施例9: 末梢投与したエリスロポエチンによる網膜虚血からの保護

網膜細胞は虚血に対して非常に感受性が高く、多くは虚血ストレスの30分後には死滅する。更に、亜急性または慢性虚血は、多数の一般的なヒトの疾患、例えば、糖尿病、緑内障、黄斑変性に合併して起こる視力低下の基礎となる。現在のところ、虚血から細胞を保護する効果的な治療法はない。密着した内皮関門が血液と網膜の間に存在し、それはほとんどの大分子を排除する。末梢投与したエリスロポエチンが虚血感受性細胞を保護するかどうかを調べるために、Rosenbaumら(1997; Vis. Res. 37:3443-51)に記載されたように、急性可逆的緑内障ラットモデルを使用した。具体的には、生理食塩水を成体オスのラットの前眼房に注入し、全身動脈圧を越える圧力にして、60分間維持した。動物に生理食塩水または5000 Uエリスロポエチン/kg体重を虚血誘導の24時間前に腹腔内に投与し、更に3日間毎日投与を継続した。処理の1週間後、暗順応させたラットで網膜電図検査を行っ

40

50

た。図17および18は、機能がほとんど残存していない生理食塩水のみで処理した動物（図17、パネルC）と対比して、エリスロポエチンの投与が網膜電図（ERG）（図17、パネルD）の良好な保存と関連していることを示している。図18は、エリスロポエチン処理群および生理食塩水処理群について虚血60分後の網膜電図のa-およびb-波の振幅を比較し、エリスロポエチンによって生じる顕著な保護を示している。同様の結果が本発明の組換え型組織保護サイトカインによる処理からも得られる。

【0331】

6.10. 実施例10: 脳の損傷に起因する認知機能低下に対するエリスロポエチンの回復効果

脳に損傷を受けた後のマウスで低下した認知機能を回復させるエリスロポエチンの能力を実証するための研究においては、Brinesら、PNAS 2000, 97; 10295-10672に記載されるように、メスのBalb/cマウスに脳の鈍的外傷を与え、5日後に毎日5000 U/kg体重のエリスロポエチンの腹腔内投与を開始した。損傷の12日後に、動物を1日4回、モリス水迷路試験で認知機能について検査した。処理動物および未処理動物の両方はその試験においてうまく遂行しなかったが（遊泳時間は可能な90秒のうち約80秒であった）、図19は、脳の鈍的外傷後、損傷の5日後に開始したEPO投与による各群n=16のマウスでのモリス水迷路試験の結果を示す。最初の試験はEPO投与開始の1週間後（損傷の12日後）に開始した。両群の動物とも、可能な90秒のうち約80秒の遊泳時間であって、乏しい結果であった。エリスロポエチン処理動物はよりうまく行った（この表示では、負の値がより良い）。1日あたり4回の試行の平均を用いた。図19はそれを示す。エリスロポエチン処理の開始を損傷の30日後まで遅らせても（図20）、認知機能の回復が見られた。図20では、各群n=7のマウスを、損傷の1ヶ月後に週末を除き毎日5000 U/kgのエPOで処理した。試行の平均値はまた1日4回の試行であった。同様の結果は本発明の組換え型組織保護サイトカインによる処理からも得られる。

【0332】

6.11. 実施例11: カイニン酸モデル

カイニン酸神経毒モデルでは、BrinesらProc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97; 10295-10672の方法に従って、アシアロエリスロポエチンを5000 U/kg体重の用量で、25 mg/kgカイニン酸の投与の24時間前に腹腔内投与したが、死亡までの期間で示されるように、アシアロエリスロポエチンはエリスロポエチンと同様に効果的であることが示される（図21）。同様の結果は本発明の組織保護サイトカインによる処理からも得られる。

【0333】

6.12. 実施例12: 脊髄損傷モデル

6.12.1. エリスロポエチンおよび組織保護サイトカインを検査するラット脊髄圧迫

この研究では体重180~300gのWistarラット（メス）を用いた。動物を手術前に12時間絶食させ、優しく押さえつけて、チオペンタールナトリウム（40 mg/kg体重）の腹腔内注射によって麻酔した。皮膚浸透（プピバカイン0.25%）後、完全単一レベル（T-3）の椎弓切除術を解剖顕微鏡下で2cmの切開によって行った。0.6ニュートン（65グラム）の圧縮力を発揮する動脈瘤クリップを一時的に1分間脊髄上で硬膜外に適用することによって外傷性脊髄損傷を引き起こした。クリップを除去した後、皮膚切開を閉じ、動物を完全に麻酔から覚醒させ、各々のケージに戻した。自然な排尿が再開されるまで少なくとも1日2回膀胱触診して、ラットを継続的に観察した。

【0334】

40匹の動物を無作為に5群に分割した。対照群（I）（n=8）の動物には、切開を閉じた直後（静脈注射によって）生理食塩水を投与した。群（II; n=8）にはrhEPOを16 μg/kg体重で静脈内投与し、群（III）には本発明のアシアロ組織保護サイトカイン（アシアロエリスロポエチン）を16 μg/kg体重で静脈内投与し、群（IV）にはアシアロ組織保護サイトカインを30 μg/kg体重で静脈内投与し、群（V）には本発明のアシアロ組織保護サイトカイン（アシアロエリスロポエチン）を30 μg/kg体重で投与し、すべて動脈瘤クリップの除去直後に単回ボラス静脈注射として投与した。

【0335】

ラットの運動神経機能はBassoらの運動評価尺度の使用によって評価した。この尺度では、動物に0(後肢の運動が観察されない)から21(正常歩行)までの範囲のスコアを割り当てる。ラットの、損傷後1、12、24、48、および72時間、ならびにその後1週間の機能的欠損について、各動物が受けた処理を知らない同一の検査員が検査した。

【0336】

図22は、30日間に渡って脊髄の損傷から回復しつつあるラットの運動評価を示したグラフである。グラフから見てとれるように、エリスロポエチン(群II)または組織保護サイトカイン(群III~V)を与えたラットは損傷からより速やかに回復し、対照ラットより良好な損傷からの総合的な回復を示した。同様の結果は本発明の組換え型組織保護サイトカインによる処理についても期待できる。

10

【0337】

第二の関連研究において、動物は前記と同様の方法で損傷させた。40匹の動物を無作為に3群に分割した。対照群(n=8)の動物には、切開を閉じた直後(静脈注射によって)生理食塩水を投与した。第二群(n=8)には、一般的な脊髄損傷の治療である、メチルプレドニゾロンを1日あたり30 mg/kgで3回、その後週2回投与し、第三群には本発明の組換え型組織保護サイトカイン、S100Eを損傷後直ちに10 µg/kgの用量で投与し、すべて動脈瘤クリップの除去直後に単回ボラス静脈注射として投与した。

【0338】

ラットの運動神経機能はBassoらの運動評価尺度の使用によって評価した。この尺度では、動物に0(後肢の運動が観察されない)から21(正常歩行)までの範囲のスコアを割り当てる。ラットの、損傷後1、12、24、48、および72時間、ならびにその後1週間の機能的欠損について、各動物が受けた処理を知らない同一の検査員が検査した。

20

【0339】

図37は、42日間にわたって脊髄の損傷から回復しつつあるラットの運動評価を示したグラフである。グラフから見てとれるように、S100Eを与えたラットは損傷からより速やかに回復し、対照ラットおよびメチルプレドニゾロンを投与したラットより良好な損傷からの総合的な回復を示した。

【0340】

6.12.2. エリスロポエチンおよび組織保護サイトカインを検査するウサギ脊髄の虚血

30

この研究では、体重1.5~2.5 kgの36匹のNew Zealand Whiteウサギ(8~12月齢、オス)を使用した。動物を12時間絶食させ、優しく押さえつけた。麻酔導入は100%酸素中3%ハロセンによって行い、50%酸素および50%空気の混合物中0.5~1.5%ハロセンで維持した。静脈カテーテル(22ゲージ)を左耳静脈に留置した。乳酸リンゲル液を外科的処置の間1時間あたり4 ml/kg体重(bw)の速度で注入した。手術前に、感染症の予防のためにセファゾリン10 mg/kg-bwを静脈内投与した。動物を右側臥位に静置し、皮膚をポビドンヨードで前処理し、プピカイン(0.25%)を浸透させ、第12肋骨で脊椎に平行して隣接した皮膚を切開した。皮膚および皮下胸腰筋膜の切開後、腰最長筋および腰腸筋を開創した。腹大動脈を左後腹膜からのアプローチによって露出させ、左腎動脈のすぐ下方に移動させた。1本のPE-60チューブを左腎動脈よりすぐ末梢側においてその大動脈の周囲で輪にして、両端をより太いゴムチューブに挿入した。PEチューブを引くことによって、その大動脈を非外傷的に20分間閉塞させた。ヘパリン(400 IU)を静脈内ボラスとして大動脈閉塞の前に投与した。20分間の閉塞後、チューブおよびカテーテルを除去し、切開を閉じ、動物を完全回復まで観察し、その後神経機能について段階的に評価した。

40

【0341】

36匹の動物を無作為に6群に分割した。対照群(I)において、動物(n=6)には大動脈閉塞からの解放直後に生理食塩水の静脈内投与を行った。群(II)にはrhEPOを6.5 µg/kg-bwで投与し、群(III)には組織保護サイトカイン(カルバミル化エリスロポエチン)を6.5 µg/kg-bwで投与し、群(IV)には別の組織保護サイトカイン(アジアロエリスロポエチン)を6.5 µg/kg-bwで投与し、群(V)には群(IV)と同一の組織保護サイトカイン(

50

アジアロエリスロポエチン)を20 μ g/kg-bwで投与し、群(VI)には更に別の組織保護サイトカイン(アジアロカルバミル化エリスロポエチン)を20 μ g/kg-bwで投与し、すべて再灌流直後に静脈内に投与した(各群についてn=6)。

【0342】

運動機能はDrummondおよびMooreの基準に従って、再灌流の1、24、および48時間後、処理を知らない検査員が評価した。0から4のスコアを次のように割り当てた。すなわち、0 = 明白な下肢運動機能を持たない下半身不随、1 = 貧弱な下肢運動機能、弱い抗重力運動のみ、2 = 良好な抗重力強度を有する中程度の下肢運動機能であるが、体の下に脚を引きつけることができない、3 = 体の下に脚を引きつけ跳躍することができる優れた運動機能であるが、正常ではない、4 = 正常な運動機能である。下半身不随の動物においては、1日2回膀胱から手で排尿させた。

10

【0343】

図23は回復しつつあるウサギの運動機能を示したグラフである。グラフは、わずか2日間だけでもエリスロポエチンおよび本発明の組織保護サイトカインがウサギの脊髄損傷からのより完全な回復を可能にすることを実証した。同様の結果は本発明の組換え型組織保護サイトカインによる治療上の処置についても期待できる。

【0344】

6.13. 実施例13: エリスロポエチンの抗炎症作用

in vivoでの研究

ラットでのMCAO

20

体重250~280gのオスCrl:CD(SD)BRラットをCharles River, Calco, Italyから入手した。これらのラットに対して、Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C., Itri, L.M.およびCerami, A. 2000 Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury, Proc Natl Acad Sci USA 97:10526-10531の教示に従って外科手術を行った。簡潔には、ラットを抱水クロラル(400 mg/kg-bw, i.p.)で麻酔し、頸動脈を見えるようにして、右頸動脈を2針の縫合および切断によって閉塞させた。右眼窩に隣接した吻側の穿孔はMCAの可視化を可能にし、それを鼻動脈の末梢側で焼灼した。この固定されたMCA損傷の周縁部(境界域)を作るために、対側の頸動脈を精密鉗子によるけん引によって1時間閉塞させ、その後再開させる。PBSまたはrhEPO(5,000 U/kg体重、腹腔内; 以前にこのモデルにおいて保護することを示した(1))をMCAOの直後に投与した。記述がある場合には、大脳皮質ホモジェネートにおいてTNFおよびIL-6を以前に記載されたように(8)定量した。MCP-1は、市販のELISAキット(biosource, Camarillo, CA)を用いてそのホモジェネートで測定された。

30

【0345】

MCAOの24時間後、ラットを上述のように麻酔し、100 ml生理食塩水で心臓から灌流し、続いて250 mlリン酸ナトリウム緩衝化4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流した。脳を速やかに摘出し、リン酸ナトリウム緩衝化4%パラホルムアルデヒド溶液で2時間固定し、PBS中20%のショ糖溶液に移し一晩置き、その後30%ショ糖溶液に沈むまで浸し、その後2-メチルブタン中-45で凍結した。切片(30 μ m)をcryostat(HM 500 OM, Microm)によって-20で脳の横断面に切り、異なる抗原に対する組織化学またはヘマトキシリン・エオシン染色のために5切片毎に選択した。浮遊切片を、抗グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)マウスモノクローナル抗体(1:250, Boehringer Mannheim, Monza, Italy)および抗cd11b(MRC 0X-42)マウスモノクローナル抗体(1:50, Serotec, UK)の両方による免疫反応について、それぞれHouserらによって記載された方法および製造メーカーの方法に従って処理した。すべての切片を、光学顕微鏡検査のために、コートしたスライド上の生理食塩水にマウントし、等級化アルコールによって脱水し、キシレンで固定し、DPX mountant(BDH, Poole, UK)を用いてカバースリップで覆った。隣接した切片を、(10)に記載したようにヘマトキシリン・エオシンで染色した。

40

【0346】

50

図24は、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した大脳皮質の冠状断面を示す。対照ラットは(A)であり、PBSで処理した虚血ラットは(B)であり、rhEPO(5,000 U/kg-bw, i.p. MCAOの直後)で処理した虚血ラットは(C)である。対照(A)と比較すると、切片Bは炎症と一致した組織染色の著しい減少を示し、神経成分の喪失を伴った。rhEPOの全身投与は虚血性障害を大きく減少させ、細胞死または損傷を限られた領域に局在させた(C)(倍率2.5x。サイズバー=800 μ m)。

【0347】

図25は、GFAP抗体で染色した梗塞領域に隣接した前頭皮質の冠状断面を示す。対照ラットは(A)であり、PBSで処理した虚血ラットは(B)であり、rhEPOで処理した虚血ラットは(C)である。活性化された星状細胞は、それらのGFAP陽性処理によって可視化される(パネルB)。典型的なrhEPO処理動物における数ならびに染色強度の著しい減少は特筆に値する(パネルC)(倍率10x。サイズバー=200 μ m)。

10

【0348】

図26は、OX-42抗体で染色した大脳皮質の冠状断面を示す。PBSで処理した虚血ラットは(A)であり、rhEPOで処理した虚血ラットは(B)である。虚血大脳半球において、細胞染色は両処理群の梗塞組織の周囲で特に顕著であるが、それは生理食塩水処理群でより一層濃く、より一層拡大している(倍率20x。サイズバー=100 μ m)。

【0349】

図27は、OX-42抗体で染色した梗塞領域に隣接した大脳皮質の冠状断面を示す。rhEPOで処理した虚血ラット(B)と比較して、PBSで処理した虚血ラット由来の組織(A)において、非常に高密度の単核炎症細胞が観察された。典型的な円形の浸潤性白血球は、潜在的に梗塞の体積を拡大させる(倍率10x。サイズバー=200 μ m)。

20

【0350】

同様の結果は本発明の組換え型組織保護サイトカインによる治療上の処置についても期待できる。

【0351】

Lewisラットにおける急性実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)

メスLewisラット、6~8週齢をCharles River(Calco, Italy)から購入した。7 mg/mlの加熱殺菌M. tuberculosis H37Ra(Difco, Detroit, MI)を添加した等量の完全フロイントアジュバント(CFA, Sigma)で乳化した水中の50 μ gのモルモットMBP(Sigma, St. Louis, MO)を、100 μ lの最終容量で軽いエーテル麻酔下で両方の後足蹠に注射することによって、ラットにEAEを誘発させた。ラットを盲式方法でEAEの徴候について検査し、以下のようにスコアを付けた。すなわち、0、疾患なし；1、弛緩した尾；2、運動失調；3、尿失禁を伴う完全な後肢麻痺。免疫の3日後から、ラットに1日1回表示された用量でPBS中のr-Hu-EPO(EPOetin alfa, Procrit, Ortho Biotech, Raritan, NJ)を腹腔内に(i.p.)投与した。臨床グレードのEPOはヒト血清アルブミンを含むため、対照動物には常に同一量のヒト血清アルブミンを含むPBSを投与した。日量5,000 U/kg-bw EPOの投与は、30%ほどヘマトクリットを上昇させた。記述がある場合には、ラットにs.c.で3日目から18日目まで1日1回、1 mg/kg-bwのDEXに相当するPBSに溶解した1.3 mg/kg-bwデキサメタゾン(DEX)リン酸二ナトリウム塩(Sigma)を注射した。記述がある場合には、脳および脊髄ホモ

30

40

【0352】

図28は、MBPによる免疫後3日目から18日目まで投与した異なる用量のEPOの、EAEの臨床的徴候に対する保護効果を示す。EPOは、表1に要約されるように、用量依存的に疾患の発症を遅延させ、疾患の重症度を減少させたが、最も重症になるまでの時間は遅延させなかった。この表に示されるように、2,500および5,000 U/kg-bwの用量でEPOは有意に平均累積スコアを減少させた。

【0353】

疾患が緩解した後EPO処理を中断し、ラットを2ヶ月まで観察した実験では、投与を中止

50

した後に疾患の悪化を引き起こすDEXとは対照的に、再発は観察されなかった(図29)。同様の結果は本発明の組換え型組織保護サイトカインによる治療上の処置についても期待できる。

【0354】

in vitroでの研究

1~2日齢の新生Sprague-Dawleyラットから初代培養グリア細胞を調製した。大脳半球を髄膜から解放し、機械的に破碎した。細胞をトリプシン2.5%およびDNase 1%の溶液で分散させ、100 μ mナイロンメッシュでろ過し、10%ウシ胎仔血清、0.6%グルコース、ストレプトマイシン(0.1 mg/ml)およびペニシリン(100 U/ml)を添加したイーグル最小必須培地に播種した(35 mmディッシュ当たり140,000細胞)。グリア培養物は週2回栄養補給し、5%CO₂の加湿インキュベータ中37 $^{\circ}$ Cで培養した。すべての実験は、GFAPおよびGriffonia simplicifoliaイソレクチン4Bの免疫化学によって評価したように、97%星状細胞および3%マイクログリアを含む2~3週目のグリア細胞培養物で行った。18日ラット胎仔の海馬から神経細胞培養物を樹立した。脳を摘出し、髄膜から解放して、海馬を分離した。細胞を2.5%トリプシン溶液中37 $^{\circ}$ Cで15~20分間インキュベートすることによって分散させ、続いてタイトレートした。細胞懸濁液をグリア細胞のために使用した培地で希釈し、ポリオルニチンコートしたカバースリップ上に、カバースリップ当たり160,000細胞の密度で播種した。播種の翌日、カバースリップを、シトシンアラビノシド5 μ Mを添加した神経細胞維持培地(5 μ g/mlインスリン、100 μ g/mlトランスフェリン、100 μ g/mlブトレシン、30 nM亜セレン酸ナトリウム、20 nMプロゲステロンとペニシリン 100 U/mlを添加したダルベッコ改変イーグル培地およびHam's nutrient mix F12)中のグリア単層を含むディッシュに移した。カバースリップは、海馬神経細胞がグリア単層に面するように反転させた。カバースリップに付着したパラフィンの点はグリア上でそれらを支持し、2種類の細胞が互いに接触することを妨げたが可溶性物質の拡散を可能にする狭い隙間を作った。これらの培養条件は、微小管結合タンパク質2およびGFAPの免疫化学で評価したように、98%以上の均一性を有する分化した神経細胞培養物の成長を可能にした。細胞をその後、rhEPO(10 U/ml)の存在下または非存在下において1 μ Mトリメチルスズ(TMT)で24時間処理し、上清をTNFアッセイのために使用し、細胞の生存能を下記のように評価した。記述がある場合は、グリア細胞をLPS存在下で24時間、rhEPOとともにまたはrhEPOなしで培養し、培養上清でTNFを測定した。細胞の生存能は3-(4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド(MTT)アッセイによって測定した(Denizot, F.,およびLang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 89:271-277)。簡潔には、MTTテトラゾリウム塩を無血清培地に最終濃度0.75 mg/mlで溶解し、処理の最後に37 $^{\circ}$ Cで3時間、細胞に添加した。その後、培地を除去し、ホルマザンを1N HCl:イソプロパノール(1:24)で抽出した。560 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーで読み取った。

【0355】

図30は、rhEPOが神経細胞-グリア混合培養物において神経細胞死誘導性のTNF産生を抑制することを示す。パネルAはrhEPO(10 U/ml)による処理無し、または有りでの、TMT 1 μ Mによって誘導される神経細胞死の割合を表す。パネルBは神経細胞の存在下(斜線の棒グラフ)または非存在下(黒塗りの棒グラフ)における、rhEPO(10 U/ml)の有無での、TMT 1 μ Mに曝露されたグリア細胞からのTNF- α の放出を表す。同様の結果は本発明の組換え型組織保護サイトカインによる治療上の処置についても期待できる。

【0356】

6.14. 実施例14: NMDA誘導性細胞死アッセイ

興奮毒性はN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体のようなグルタミン酸受容体の過剰な活性化として定義できる。NMDA受容体は、虚血および他の外傷にตอบสนองして活性の増加を示す(Fauciら、1998, Harrison's Principles of Internal Medicine)、(Nishizawa, 2001, Life Sci. 69, 369-381)、(Whiteら、2000, J. Neurol. Sci. 179, 1-33)

。従って、このアッセイは細胞傷害および細胞死に対する化合物の効果を評価するためのモデルとして役に立つ。

【0357】

初代海馬神経細胞でのNMDA興奮毒性の方法

初代培養海馬神経細胞は、基本的に以前Krohnら(1998)によって記載された方法で、(24時間未満の)新生マウスから調製された。簡潔には、海馬を0.02%BSAを含むDMEM中で細切した。組織を0.1%パパインを含むDMEMに移し、20分間37℃でインキュベートした。パパインを含む培地の吸引およびMEMIIの添加によって消化を止め、1000μlピペットチップを用いた上下操作によって海馬細胞を解離させた。組織片を沈殿させ、単細胞を含む上清を1%トリプシンインヒビター(type II-0)および1%BSAを含むMEMIIに移した。解離段階を3回くり返した後、単細胞を600U/分で10分間遠心分離し、生育培地(MEMII、20mM D-グルコース、100U/mlペニシリン、100μgストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、10% Nu-serum(ウシ)、2%B27サプリメント、26.2mM NaHCO₃)に再懸濁した。10個の海馬からの細胞を用いて、1枚の24ウェルプレートに播種した。播種1日後に、細胞をシトシンアラビノフラノシド(1μM)で処置した。2日目に、培地を交換し、シトシンアラビノフラノシド(1μM)を添加した。

10

【0358】

興奮毒性アッセイ

12日目の培養物を5nMのテスト化合物(ビヒクル、R103E、R150E、またはEP0)で24時間前インキュベートした。13日目に、培地を細胞から除去して保存した一方、培養物を5分間室温で300μM NMDAに曝露した。興奮毒性損傷の後、前馴化培地を培養物に戻し、更に24時間インキュベートした後トリパンプルー排除によって損傷を定量した。少なくとも4つの別々のウェルで条件あたり約300個の神経細胞を数え、実験は少なくとも2回くり返した(Krohn, A.J., Preis, E. およびPrehn, J.H.M. (1998) J. Neurosci. 18(20):8186-8197)。

20

【0359】

図31は、ヒト・エリスロポエチンならびに組換え型組織保護サイトカインR130EおよびR150Eが、NMDA処理に先立って初代培養海馬神経細胞に添加された場合、NMDAによって誘導される細胞死を効果的に減少させたことを示す。R103E(5nM)で処置した細胞は、ビヒクル対照細胞と比較して、有意に少ない細胞死を示した(p=0.01)。R103E(5nM)で処置した細胞は、ビヒクル対照細胞と比較して、有意に少ない細胞死を示した(p=0.01)。R150E(5nM)で処置した細胞は、溶媒対照細胞と比較して、約20%の細胞死の減少を示した(p=0.001)。統計には、分散分析に加えてTukeyのポストホックテストを用いた。

30

【0360】

6.15. 実施例15: P19細胞における血清除去からの神経保護

本発明の組換え型組織保護サイトカインの神経保護効果を調べるために、P19細胞培養からの血清の除去をモデルとして用いた。クローンP19S1801A1は、W.H. Fischer博士の好意により提供された。細胞は、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリンG、100μg/ml硫酸ストレプトマイシンおよび10%ウシ胎仔血清(FCS; すべてGibco, Paisley, Scotland, UKから)を添加し、1.2g/l NaHCO₃、10mM HEPESバッファー(Carlo Erba, Milano, Italy)を含む、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(以降、完全培地と呼ぶ)中で、空气中7%CO₂の雰囲気下において加湿インキュベータ中で維持した。無血清培地(N2)は、上記と同一の成分で、血清の欠如および以下の添加、すなわち、5μg/mlインスリン、100μg/mlトランスフェリン、20nMプロゲステロン、100μMプトレシンおよび30nM Na₂SeO₃(すべてSigmaから)を含む。細胞死実験のために、細胞を10%パンクレアチン(Gibco)で解離させ、完全培地で1回、N2培地で2回洗浄し、他に指示がない限り25cm²組織培養フラスコ(Falcon Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey)の5mlの無血清培地に10⁴細胞/cm²の最終密度で播種した。Lアセチルカルニチン(100μM)は陽性対照として採用され、それは保護をもたらし、血清除去の24時間後のアポトーシス核の割合を50%まで減少させる。血清除去の24時間後、細胞を、フラスコをたたいて(トリプシンなしで)剥離

40

50

させ、cytospin centrifugation (Shandon Southern, USA) によって600 rpm、10分間で顕微鏡スライド上に播種し、Carnoy液 (メタノール:酢酸、3:1) で10分間固定し、Hoechst 33258 (0.1 µg/ml PBS) によって1時間37 °Cで染色し、水道水で15分間洗浄し、風乾して標本とした。スライドは蛍光顕微鏡 (Zeiss, Germany) によって365 nmの励起波長で観察した。アポトーシス核の割合は、盲検で少なくとも5回の測定で合計100個の細胞を数えることによって決定した。

【0361】

P19細胞を3 nMのEpoまたは組換え型組織保護サイトカインS100Eとともに24時間前インキュベートした。この処理は、血清除去によって誘導されるアポトーシスからの有意な ($p < 0.001$) 保護をもたらした。データは1つの実験における3回反復の測定からの平均値である。実験は2回実施し、同様の結果を得た。

10

【0362】

図32は、P19細胞における血清除去からの神経細胞保護を示す。アポトーシス細胞の割合は、Epo、EpoWT、および組換え型組織保護サイトカインS100Eで前処理した細胞で減少した。Epoで処理した細胞は、未処理の対照細胞と比較してアポトーシス細胞死について約20%の減少を示した。EpoWTおよびS100Eで処理した細胞はともに、未処理の対照細胞と比較してアポトーシス細胞死の約10%減少を示した。

【0363】

6.16. 実施例16: 分化させたPC12細胞におけるNGF除去

本発明の組換え型組織保護サイトカインの神経保護効果を調べるために、分化させたPC12細胞におけるNGFの除去をモデルとして用いた。このアッセイは十分に確立されたアポトーシスのモデルである。このラットPC12細胞株は副腎髄質の褐色細胞腫に由来し、NGFの存在下で神経様細胞に分化させられる (Masudaら、1993, J Biol Chem 268, 11208-11216)。PC12細胞株は、NGF存在下で神経様の表現型を発現するように分化させられる、神経内分泌細胞株である (Vaudryら、2002, Science 296, 1648-1649)。一度その細胞を完全に分化させると、それらはNGF依存的になり、NGFの除去はアポトーシスを誘導する。

20

【0364】

PC12細胞は、10%加熱不活性化ウマ血清、5%加熱不活性化ウシ胎仔血清、1%ピルビン酸ナトリウムおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン (P/S) (Invitrogen, Carlsbad, USA) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で維持した。

30

【0365】

実験のために、細胞を、7日間コラーゲンGコート48ウェルプレートにおいて24,000細胞/ウェルの密度で、1%加熱不活性化ウマ血清、1%ピルビン酸ナトリウム、1%P/Sおよび100ng/ml NGF (マウス顎下腺の7S神経成長因子、Calbiochemより購入、Cat. No.480354) を添加したDMEM中で、2~3日毎に培地交換して分化させた。6日目に、アミノ酸100でのEpo突然変異体 (=S100E) を表示した濃度で細胞に添加し24時間培養した後、培地をRPMI1640、1%P/Sに置き換えてすべての細胞からNGFを除去した。陽性対照としてS100Eを再添加し、同様にNGF (100 ng/ml) を再添加 (+NGF) した。24時間後、テトラゾリウム (MTT) 還元アッセイによって生存能を測定した。

【0366】

図33Aおよび33Bは、2つの独立した実験における、NGF除去を受けた分化PC12細胞でのS100Eによるプレインキュベーションの効果を示す。分化させたPC12細胞を24時間表示した濃度のS100Eで前処理した: 図33A (3 pM)、図33B (0.00003 pM ~ 3 pM)。生存能をMTTアッセイで測定した。NGF (100 ng/ml) を陽性対照として用い、NGFを含まない培地 (-NGF) を陰性対照として用いた。図33に提示したデータは、陽性対照 (+NGF) の生存能に対する%として示される (両実験においてn = 8)。一元配置分散分析およびBonferroniポストホックテストにより陰性対照細胞 (-NGF) と比較して、S100E処理細胞の生存率には統計的に有意な増加がある (**p < 0.001, *p < 0.05)。S100Eで観察される効果は、この検定系における効力および有効性についてEpoのそれと類似していた。

40

【0367】

50

図34は、NGF除去を受けた分化PC12細胞でのEpoによるプレインキュベーションの効果を示す。分化させたPC12細胞をEpo、S100E、またはカルバミル化Epo(30 pM~30 nM)で24時間前処理した。化学的に修飾したEpo分子であるAA24496は、UT-7細胞アッセイにおいてEPOより10000倍低い活性を有する。生存能はMTTアッセイで測定した。NGF(100 ng/ml)を陽性対照として用い、NGFを含まない培地(-NGF)を陰性対照として用いた。

【0368】

6.17. 実施例17: UT-7細胞増殖のEPOバイオアッセイ

UT-7は、K45Dなどの組換え型組織保護サイトカインの赤血球効果の測定のために使用される白血病Epo依存性細胞株である。UT-7細胞(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Cat. No. ACC 363)は10%FBSおよび5 ng/ml Epoの存在下で正常に増殖させた。Epoに曝露された細胞の増殖/生存能(=生存能増加)応答は、古典的な末梢型Epo受容体によって仲介される。増殖応答は、古典的なEpo受容体を刺激するEpo変異型の能力の定量的尺度であり、これと相関する。

10

【0369】

UT-7細胞生存能アッセイの方法

ヒト白血病細胞株UT7はEpo依存性であり、添加されたEpo/組換え型組織保護サイトカインに対する増殖応答は、それらの生物学的活性の測定に使用された。アッセイ1日目に、細胞を、Epo(5 ng/ml)(5 ng/ml rhuEPOを添加した10%ドナー仔ウシ血清、4mM L-グルタミン)を含んでいる10%血清を含む新しい完全RPMI 1640培地に移した。細胞を、75cm²フラスコで20ml培養物/フラスコで増殖させた。アッセイ2日目に、細胞をフラスコから50 mlのコニカルチューブに移し、1,000 rpmで5分間室温で遠心分離した。古い培地を廃棄し、細胞を10mlの飢餓培地(3%ドナー仔ウシ血清、4 mM L-グルタミン)で2回洗浄した。細胞をピペットの上下操作によって飢餓培地に再懸濁し、単細胞懸濁液を得た。細胞密度を決定するために、再懸濁した細胞を飢餓培地に希釈し10 mlの全培養量に4 x 10⁵細胞/mlの密度にして、25cm²フラスコに播種した。混合物を5%CO₂、37 °Cの加湿インキュベータで4時間インキュベートした。インキュベータの最後の1時間に、96ウェルプレートを調製した。4時間のインキュベータの終わりに、細胞培養物をインキュベータから取り出し、細胞をフラスコから50 mlのコニカルチューブに移した。細胞の懸濁を維持するために、内容物を手動で混合した。50 mlの飢餓培地を、細胞を含まないブランク培地として添加した。5ウェルは試薬を含まない対照細胞とした。次の隣接した列のウェルは最も低い濃度の組換え型組織保護サイトカインを含んだ。その後隣接する各列のウェルは、順次、より高い濃度で充填された。3%血清を含みEpoを含まない培地でインキュベートした細胞培養物を200,000細胞/mlで96ウェルプレートにウェル当たり100 µlで播種した。内容物を、攪拌プレート上に設置した環状振動台を用いて、短時間慎重に混合した。プレートを異なる濃度のEpo変異型(0.2 pM~20 nM)とともに、3%血清を含むRPMI 1640培地で5%CO₂、37 °Cの加湿インキュベータにおいて48時間インキュベートした。アッセイ4日目に、96ウェルプレートをインキュベータから取り出し、室温で層流フード内に静置した。直ちに、テトラゾリウム色素WST1の細胞代謝の際に形成されるホルマジン生成物を測定することによって、生物活性を定量した(620nmのバックグラウンド吸光度を差し引いた、450nmの分光学的吸光度)。該活性は細胞の生存能/細胞数と相関する。

20

30

40

【0370】

結果

UT7細胞は、Epoを含む培地において3ヶ月間安定した信頼できる増殖を示した。

【0371】

K45Dは、EC₅₀ 294.0で用量依存的にEpo依存性UT-7細胞の生存能増加を誘導した。比較して、EC₅₀はEpoに対して58.13(図35)であり、ヒスチジンでタグ付けされたEpo(Epo WT)に対して608であった。S100Eは、< 50 nM(すなわち測定可能な範囲)の濃度で、Epo依存性UT-7細胞の生存能を(50%以上)増加させなかった。従って、K45DはEpoと同じ桁での効力を示し、一方、S100EはEpoと比較して少なくとも1000倍低い効力を示した。

50

【0372】

R103Eは、20 nMまでの濃度でEpo依存性UT-7細胞の生存を増加させず、すなわち、Epoと比較したその効力は少なくとも4桁低かった。R150Eは、 EC_{50} 20 nMで用量依存的にEpo依存性UT-7細胞の生存を誘導した。これと比較して、 EC_{50} はEpo (Epo#4) については66.5であった(図36)。従って、R150EはEpoと比較して3桁低い効力を示した。

【0373】

図35は、UT-7細胞におけるEpo、K45DおよびS100Eの濃度反応曲線を示す。異なる濃度のEpo、EpoWT、K45DおよびS100EをUT-7細胞に添加した。生存能はWST-1アッセイを用いて48時間後に測定した。データは、各々2回反復で行った3つの異なる実験の平均値 \pm SDである。曲線は非線形回帰曲線である。

10

【0374】

図36は、UT-7細胞におけるEpo、R103EおよびR150Eの用量応答曲線を示す。異なる濃度のEpo、EpoWT、R103EおよびR150EをUT-7細胞に添加した。生存能はWST-1アッセイを用いて48時間後に測定した。データは、各々2回反復で行った3つの異なる実験の平均値 \pm SDである。曲線は非線形回帰曲線である。

【0375】

6.18. 実施例18: 末梢投与された組換え型組織保護サイトカインによる網膜虚血の保護

6.9項に記載したように、網膜細胞は多くが虚血ストレスの30分後には死滅するように、虚血に対して非常に感受性が高い。この実験では、Rosenbaumら(1997; Vis. Res. 37: 3443-51)によって記載されたように、ラットの可逆性緑内障モデルを再度利用した。組

20

【0376】

各ラットの片眼を、6.9項に示した実施例において成体オスラットの前眼房への生理食塩水の注入のために概説した方法に従って損傷させた。再灌流時、すなわち前眼房の圧力が解放される際に、ラットに10 μ g/kg EPO、4種の組換え型組織保護サイトカインR103E、R150E、S100EおよびS100E/K45Dのうちの1つ、または生理食塩水を静脈内投与した。損傷後1、3、5および6日目に、各ラットの損傷した眼と正常な眼の両方で網膜電図検査を行った。各ラットの損傷した眼における潜時を、同一ラットの正常な眼での潜時と比較した。データは、損傷した眼の潜時と正常な眼の潜時の比として記録され、損傷した眼が正常な機能を有する場合、結果として比は1となる。損傷の結果には2つの構成要素がある。すな

30

【0377】

図38は、様々な治療計画について損傷した眼の潜時と正常な眼の潜時の比を示す。EPOで処置されたラットは1.2の潜時を示し、生理食塩水で処置されたラットより良好であった。4種の組換え型組織保護サイトカインの各々は、EPOと同等またはより良好な潜時結果となり、R103E、R150EおよびS100Eは生理食塩水に比して統計上の改善を示した。

【0378】

本発明は、本発明の個々の態様の単一の説明を意図して記載された、特定の実施形態によって範囲を限定されず、機能的に同等な方法および成分は本発明の範囲内にある。実際

40

【0379】

本明細書に引用されるすべての参考文献は、参照により本明細書にそれら全体をあらゆる目的のために組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0380】

【図1】抗エリスロポエチン抗体を用いて染色した、正常ヒト脳の薄い切片におけるエリスロポエチン受容体の分布を示す。

50

- 【図2】図1の画像をより高い倍率で観察したものである。
- 【図3】金で標識した第二抗体を用いた、エリスロポエチン受容体の超ミクロの分布を示す。
- 【図4】図3と同様に調製した、ヒト脳毛細管の管腔および抗管腔表面にある高密度のエリスロポエチン受容体を示す。
- 【図5】非経口投与されたエリスロポエチンの脳脊髄液中へのトランスロケーションを示す。
- 【図6A】エリスロポエチンならびに組換え型組織保護サイトカイン（K45DおよびS100E組換え型組織保護サイトカインを含む）についてのSK-N-SH神経芽腫細胞神経保護アッセイ（ロテノンに対する）の結果を示す。グラフのy軸は吸光度値を示し、データは2回反復測定 of 平均 ± 範囲である。図6Aのグラフは、K45DおよびS100Eサンプル内の細胞の生存能が維持されたことを明確に示しており、それらの細胞保護作用を実証している。 10
- 【図6B】hEP0-6xHisTag-PCiNeoのプラスミド地図を示す。
- 【図7】血清欠乏P19細胞の生存能に及ぼすエリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの*in vitro*効力を比較した図である。
- 【図8】血清欠乏P19細胞の生存能に及ぼすエリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの*in vitro*効力を比較する別の実験を示す。
- 【図9】ラット限局性大脳虚血モデルにおけるエリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの保護を示す。
- 【図10】虚血発作モデルにおける、中大脳動脈閉塞におけるヒト・エリスロポエチンおよびヒト・アジアロエリスロポエチンの効力を比較する用量応答を示す。 20
- 【図11】P19アッセイにおけるヨウ素化エリスロポエチンの活性を示す。
- 【図12】P19アッセイにおけるビオチン化エリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの効果を示す。
- 【図13】血清欠乏P19細胞の生存能に及ぼすエリスロポエチンおよびフェニルグリオキサル改変エリスロポエチンの*in vitro*効力を比較した図である。
- 【図14】水中毒アッセイにおける組織保護サイトカインの効果を示す。
- 【図15】エリスロポエチンによる移植用に調製された心臓の機能維持を示す。
- 【図16】一時的な血管閉塞の後の虚血損傷からのエリスロポエチンによる心筋層の保護を示す。 30
- 【図17】A、B、CおよびDは、ラット緑内障モデルにおけるエリスロポエチン治療の効力を示す。
- 【図18】ラット緑内障モデルにおけるエリスロポエチンによる網膜機能の保存の程度を示す。
- 【図19】脳外傷を負った5日後にエリスロポエチン投与を開始することによる、脳外傷後の認知機能の回復を示す。
- 【図20】脳外傷を負った30日後にエリスロポエチン投与を開始することによる、脳外傷後の認知機能の回復を示す。
- 【図21】大脳毒性のカイニン酸モデルにおけるヒト・アジアロエリスロポエチンの効力を示す。 40
- 【図22】ラット脊髄損傷モデルにおける組織保護サイトカインの効力を示す。
- 【図23】ウサギ脊髄損傷モデルにおける組織保護サイトカインの効力を示す。
- 【図24】A、BおよびCは、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した脳皮質層の冠状切断を示す。
- 【図25】A、BおよびCは、GFAP抗体で染色した、梗塞領域に隣接する前頭皮質の冠状切断を示す。
- 【図26】AおよびBは、OX-42抗体で染色した脳皮質層の冠状切断を示す。
- 【図27】AおよびBは、OX-42抗体で染色した、梗塞領域に隣接する脳皮質層の冠状切断を示す。
- 【図28】EAEモデルにおける炎症に対するエリスロポエチンの効力を示す。 50

【図29】EAEモデルにおける炎症に対するデキサメタゾンおよびエリスロポエチンの影響を示す。

【図30】AおよびBは、エリスロポエチンがニューロン死と関連した炎症を抑制することを示す。

【図31】ヒト・エリスロポエチンならびに組換え型組織保護サイトカインR130EおよびR150Eが、NMDA処理前に初代海馬神経細胞培養物に添加したとき、NMDAにより誘導された細胞死を効果的に減ずることを示す。

【図32】P19細胞における血清除去からの神経細胞保護を示す。

【図33】AおよびBは、2つの独立した実験においてNGF除去を受けた分化PC12細胞におけるS100Eとのプレインキュベーションの効果を示す。

10

【図34】A、BおよびCは、NGF除去を受けた分化PC12細胞におけるEpoとのプレインキュベーションの効果を示す。

【図35】UT-7細胞におけるEpo、K45DおよびS100Eの濃度-反応曲線を示す。

【図36】UT-7細胞におけるEpo、R103EおよびR150Eの用量応答曲線を示す。

【図37】42日間にわたる、脊髄外傷から回復するラットの歩行運動評価を示すグラフである。

【図38】種々の治療計画についての正常な眼の潜時に対する傷を負った眼の潜時の比を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kenneth S. Warren Industries, Inc.
H. Lundbeck A/S

<120> RECOMBINANT TISSUE PROTECTIVE CYTOKINES AND ENCODING NUCLEIC
ACIDS THEREOF FOR PROTECTION, RESTORATION, AND ENHANCEMENT OF
RESPONSIVE CELLS, TISSUES AND ORGANS

<130> 10165-022-228

<140>
<141>

<150> 60/392,455
<151> 2002-07-01 10

<150> 60/393,423
<151> 2002-07-03

<160> 212

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Val Leu Gln Arg Tyr 20
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens 30

<400> 3
Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu
1 5

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Asn Phe Leu Arg Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 5

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Glu Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

10

20

30

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 6
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 6

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Asp Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

10

20

30

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 7
 <211> 580
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggctg tggettctcc tgtccctgct gtcgctccct 60 10
 ctgggcctcc cagtctctggg cgtcccaacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180
 agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240
 atggaggctg ggcagcaggc cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct 300
 gtctctgggg gccaggccct gttggtcaac tcttccagc cgtgggagcc cctgcaactgc 360
 atgtggataa agcctcagc ggccttcgca gcctcaccac tctgcttggg gctctggggg 420
 cccagaagga agccatctcc cctccagatg cggcctcagc tgctccactc cgaacaatca 480
 ctgctgacac tttcgcaaac tcttccgagt ctactccaat ttcctccggg gaaagctgaa 540 20
 gctgtacaca ggggaggcct gcaggacagg ggacagatga 580

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
 agctctcgag gcgaggagat gggggtgcac gaatg 35

<210> 9
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9
 atgctctaga cacactggg catctgtccc ctgtcc 36

<210> 10

10

20

30

<211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

10

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

20

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

30

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 11
 <211> 45
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11
catgtggata aagccgtcga gggccttcgc agcctcacca ctctg 45

<210> 12
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial 10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
cagagtggtg aggctgcgaa ggccttcgac ggctttatcc acatg 45

<210> 13
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13
gagaatatca ctgtcccaga caccgacgtt aatttctatg cctgg 45 20

<210> 14
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14
ccagcatag aaattaacgt cgggtctctgg gacagtgata ttctc 45

<210> 15
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial 30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutain

<400> 15

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ala Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 16
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 16

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu

10

20

30

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Ile Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 18
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 18

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

10

20

30

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Ser Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

10

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

20

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

30

<210> 19
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 19

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Ala Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

10

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

20

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

30

<210> 20
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 20

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

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

10

20

30

<210> 21
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein
 <400> 21

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

10

20

30

Arg

<210> 22
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein
 <400> 22

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

10

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

20

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

30

Arg

<210> 23
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 23

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Glu Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

10

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

20

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

30

Arg

<210> 24

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 24

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Gln Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 25

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

20

30

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 25

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Ala Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 26

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

10

20

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutetin

<400> 26

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Phe Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

10

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

20

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

30

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 27

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mутein

<400> 27

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Ile Leu Leu Glu Ala Glu Glu
 35 40 45

10

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

20

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

30

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 28

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 28

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Glu Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 29

<211> 193

10

20

30

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 29

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

10

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Ala Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

20

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

30

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 30

<211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 30

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Ala
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

10

20

30

<210> 31
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 31

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Lys Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

10

20

30

<210> 32
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutain

<400> 32

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Ser Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

10

20

30

<210> 33
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 33

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

10

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

20

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

30

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 34
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 34

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

10

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Asn Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

20

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

30

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 35
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 35

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

10

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu Thr Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

20

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

30

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 36
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 36

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Ser Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

10

20

30

Arg

<210> 37
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 37

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Tyr Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp

10

20

30

180

185

190

Arg

<210> 38
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

10

<400> 38

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

20

Lys Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

30

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 39
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

10

<400> 39

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

20

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Lys Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

30

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 40
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 40

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Asn Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

10

20

30

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 41
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 41

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Ala Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu

165

170

175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 42
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 42

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Ala Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 43
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 43

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Ile Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 44
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 44

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Asp Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 45
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 45

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Ala Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile

10

20

30

145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 46
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 46

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Ala Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

10

20

30

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

10

<210> 47
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 47

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

20

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Ala Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

30

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

10

<210> 48
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 48

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

20

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Ile Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

10

<210> 49
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 49

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

20

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Ala Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

10

Arg

<210> 51
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 51

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

20

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Ser Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

10

Arg

<210> 52
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 52

20

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Phe Lys Arg
 65 70 75 80

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

10

Arg

<210> 53
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 53

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

20

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Asn Lys Arg
 65 70 75 80

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 55
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 55

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Asn Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

10

20

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

10

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 56
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

20

<400> 56

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

30

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Thr Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 57
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 57

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Ser Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser

10

20

30

Ala Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

10

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 59
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutain

<400> 59

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

30

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Arg Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

10

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 60
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 60

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

30

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

10

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 61
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 61

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

30

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Arg Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

10

Arg

<210> 62
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein
<400> 62

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Glu Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 63
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 63

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

10

20

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ala Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

10

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

20

<210> 64
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 64

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Thr Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 65
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 65

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg

10

20

30

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Ile
115 120 125

10

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

20

Arg

<210> 67
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutton

<400> 67

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

30

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

10

Ala Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

20

Arg

<210> 68
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 68

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

30

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Ala Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 69
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 69

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

10

20

30

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

10

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ala Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

20

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

- <210> 71
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

30

<400> 71

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

10

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ile Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

20

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 72
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

30

<400> 72

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Ala Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

- <210> 73
- <211> 193
- <212> PRT
- <213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 73

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Ieu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ieu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu

10

20

30

35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Ala Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

10

20

Arg

<210> 74
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 74

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

10

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Ile Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

20

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 75
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 75

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

10

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Ala Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

20

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 76
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 76

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Leu Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 77
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutain

<400> 77

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu

10

20

30

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

10

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Ala Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

20

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

30

<210> 79
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 79

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

10

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Ser Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

20

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

30

<210> 80
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 80

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Ala Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 81
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 81

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

10

20

30

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

10

20

30

<210> 82
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein
 <400> 82

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

10

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

20

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Ala Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

30

Arg

<210> 83
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 83

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

10

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

20

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ala
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

30

Arg

<210> 84

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 84

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Ala Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 85

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

10

20

30

<400> 85

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 85
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

10

20

30

<223> Description of Artificial Sequence: muteln

<400> 86

```

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1           5           10           15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
           20           25           30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
           35           40           45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
           50           55           60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65           70           75           80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
           85           90           95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
           100          105          110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
           115          120          125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
           130          135          140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145          150          155          160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Ile Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
           165          170          175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
           180          185          190

```

Arg

```

<210> 87
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

```

10

20

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 87

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

10

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

20

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Ala Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

30

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 88

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 88

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ala Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 89

<211> 193

<212> PRT

10

20

30

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 89

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Lys Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 90

<211> 193

10

20

30

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 90

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Ala Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 91

10

20

30

<211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 91

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

10

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

20

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

30

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Tyr Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 92
 <211> 193
 <212> PFT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 92

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Ala Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

10

20

30

<210> 93
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 93

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Ala
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

10

20

30

<210> 94
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 94

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

10

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

20

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

30

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Ala Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 95
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 95

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

10

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

20

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

30

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Glu Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 96
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 96

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

Arg

<210> 97
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 97

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

10

20

30

Arg

<210> 98
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 98

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Trp Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp

10

20

30

180 185 190

Arg

<210> 99
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein 10

<400> 99

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60 20

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125 30

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Ala Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 100
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

10

<400> 100

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

20

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

30

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Ala Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 101
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein
 <400> 101

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 102
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 102

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu

165 170 175
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Ala Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 103
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 103

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Ser Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 104
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 104

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Ala Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 105
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutain

<400> 105

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

20

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Ala Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 106
<211> 192
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 106

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn
50 55 60

Ile Thr Val Pro Asp Thr Asp Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65 70 75 80

Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu
85 90 95

Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln
100 105 110

Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Glu Gly Leu
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala
130 135 140

Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr

10

20

30

145 150 155 160

Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
165 170 175

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
180 185 190

<210> 107

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 107

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Asn Glu Thr Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 108
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 108

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

20

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Asp Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Glu Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 109
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 109

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

20

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

30

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Glu Ser Leu Thr Thr Ser Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190

Arg

<210> 110
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 110

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Ala Arg
 65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile

10

20

30

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

10

<210> 112
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 112

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

20

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

30

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

10

<210> 113
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 113

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

20

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

30

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 114
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 114

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Ala Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu

10

20

30

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

10

Arg

<210> 116
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 116

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

20

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Ala Val Asn Phe Tyr Ala Trp Ala Arg
65 70 75 80

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Ala Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Ala Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Ala Leu Ala Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

10

Arg

<210> 117
<211> 193
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 117

20

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Lys Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Lys Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

30

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Lys Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 118

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: mutein

<400> 118

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Ala Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Lys Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly

10

20

30

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

10

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 120
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

20

<400> 120
gtctactcca atttcctcga gggaaagctg aagctg 36

<210> 121
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 121
gcttcagctt tccctcgagg aaattggagt agac 34

30

<210> 122
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 122
ccgtcagtg ccttgagagc ctcaccactc tg 32

<210> 123

<211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 123
 cagagtggtg aggctctcaa ggccaactgac gg 32

 <210> 124
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial 10

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 124
 ccgtcagtgg cttgagagc ctcaccactc tg 32

 <210> 125
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer 20

 <400> 125
 cagagtggtg aggctctcaa ggccaactgac gg 32

 <210> 126
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 126
 cgcagcctca ccacttcgct tcgggctctg g 31

 <210> 127
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 127
 ccagagcccg aagcgaagtg gtgaggctgc g 31

 <210> 128
 <211> 40

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 128
 gaatatcact gtcccagacg gtggcgccctg gaagaggatg 40

<210> 129
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial 10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 129
 catcctcttc caggcaccac cgtctgggac agtgatattc 40

<210> 130
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 130
 tacctcttgg aggcgcggga ggccgagaat atc 33 20

<210> 131
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 131
 gatattctcg gactccgggg cctccaagag gta 33

<210> 132
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 132
 gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

<210> 133
 <211> 35
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 133
 gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 134
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial 10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 134
 atttcctccg gggagcgtg aagctgtaca cag 33

<210> 135
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 135 20
 ctgtgtacag cttcagcgt ccccgagga aat 33

<210> 136
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 136
 ctccgggaa agctggcgt gtacacaggg ga 32

<210> 137
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 137
 tcccctgtgt acagcgcag ctttccccgg ag 32

<210> 138
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 138
 actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 139
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220> 10
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 139
 caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 140
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 140
 agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35 20

<210> 141
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 141
 cgacctccat cctegcccag gcatagaaat taact 35

<210> 142
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 142
 tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 143
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 143
 ggccactgac ggotgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 144
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer 10
 <400> 144
 ctctgggagc ccaggcggaa gccatctccc ct 32

<210> 145
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 145
 aggggagatg gcttccgct gggctcccag ag 32

<210> 146
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial 20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 146
 gctgacactt tccgcgcact ctccgagtc tactc 35

<210> 147
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 147
 gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 148
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 148
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

<210> 149
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 149
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 150
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 150
gctgacactt tccgcgact cttccgagtc tactc 35

<210> 151
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 151
gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 152
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 152
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

<210> 153
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

10

20

30

<400> 153 cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact	35	
<210> 154 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 154 actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg	35	10
<210> 155 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 155 caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt	35	
<210> 156 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial		20
<220> <223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 156 tgcagctgca tgtggatgca gccgctcagtg gcc	33	
<210> 157 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: primer		30
<400> 157 ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca	33	
<210> 158 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial		
<220> <223> Description of Artificial Sequence: primer		

<400> 158
 atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 159
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 159
 ctgtgtacag cttcagcgct cccgggagga aat 33 10

<210> 160
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 160
 tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 161
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial 20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 161
 ggccaactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 162
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer 30

<400> 162
 atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 163
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 163

ctgtgtacag cttcagcgct cccgggagga aat	33	
<210> 164		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 164		
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gctg	35	10
<210> 165		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 165		
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt	35	
<210> 166		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		20
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 166		
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc	33	
<210> 167		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 167		
ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca	33	30
<210> 168		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 168		
atttctctccg gggagcgctg aagctgtaca cag	33	

<210> 169		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 169		
ctgtgtacag cttcagcgct ccccgagga aat	33	10
<210> 170		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 170		
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg	35	
<210> 171		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		20
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 171		
caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt	35	
<210> 172		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 172		
agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg	35	30
<210> 173		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 173		
cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact	35	

<210> 174		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 174		
tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc	33	
<210> 175		10
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 175		
ggccaactgac ggctgcatcc acatgcagct gca	33	
<210> 176		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		20
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 176		
attcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag	33	
<210> 177		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 177		
ctgtgtacag cttcagcgt ccccgaggga aat	33	30
<210> 178		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 178		
actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg	35	

<210> 179
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 179
 caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

<210> 180
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 180
 agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

<210> 181
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 181
 cgacotccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

<210> 182
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 182
 gctgacactt tccgcgcaact cttccgagtc tactc 35

<210> 183
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 183
 gagtagactc ggaagagtgc gcggaaagtg tcagc 35

<210> 184

10

20

30

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 184
 tgcagctgca tgtggatgca gccgtcagtg gcc 33

<210> 185
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 185
 ggccactgac ggctgcatcc acatgcagct gca 33

<210> 186
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

20

<400> 186
 atttcctccg gggagcgctg aagctgtaca cag 33

<210> 187
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 187
 ctgtgtacag cttcagcgt ccccgagga aat 33

<210> 188
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 188
 actgtcccag acaccgcagt taatttctat gcctg 35

<210> 189
 <211> 35

<212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 189
 caggcataga aattaactgc ggtgtctggg acagt 35

 <210> 190
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial 10

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 190
 agttaatttc tatgcctggg cgaggatgga ggtcg 35

 <210> 191
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 191 20
 cgacctccat cctcgcccag gcatagaaat taact 35

 <210> 192
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 192
 gctgacactt tccgcgcact cttccgagtc tactc 35

 <210> 193 30
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 193
 gagtagactc ggaagagtgc gcggaagtg tcagc 35

 <210> 194
 <211> 32
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 194
 ctccggggag cgctggcgct gtacacaggg ga 32

<210> 195
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial 10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 195
 tcccctgtgt acagcgccag cgctccccgg ag 32

<210> 196
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 196
 caaggaggcc gagaaaatca cgacgggctg t 31 20

<210> 197
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 197
 acagcccgtc gtgattttct cggcctcctt g 31

<210> 198
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 198
 actgcagctt gaatgagaaa atcactgtcc cagacac 37

<210> 199
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 199
 gtgtctggga cagtgatttt ctcatccaag ctgcagt 37

<210> 200
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer 10

 <400> 200
 aggccotggt ggtcaaatct tcccagccgt g 31

<210> 201
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 201
 cacggctggg aagatttgac caacagggcc t 31 20

<210> 202
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 202
 atttcctccg gggatggctg aagctgtaca cag 33

<210> 203
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

 <400> 203
 ctgtgtacag cttcagccat ccccggagga aat 33

<210> 204
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 204
 agccgagtcc tggaggcggc cctcttggag gccaa 35

<210> 205
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer 10

<400> 205
 ttggcctcca agagggcggc ctccaggact cggct 35

<210> 206
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 206
 agccgagtcc tggagagggc cctcttggag gccaa 35

<210> 207
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial 20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 207
 ttggcctcca agagggccct ctccaggact cggct 35

<210> 208
 <211> 6059
 <212> DNA
 <213> Artificial 30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 208
 ctagagtcga cccgggcggc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
 ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
 atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacia 180
 gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtggggaggt 240
 ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300

ggggtaatag ogaagaggcc cgcaccgac gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 360
 gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
 cgtgaccgct acaattgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttccct 480
 tctcgccacg ttccgcggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt 540
 ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggtg atggttcacg 600
 tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt 660
 taatagtgga ctcttggtcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg totattcttt 720
 tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctatttggtta aaaaatgagc tgatttaaca 780
 aaaatttaac gcgaatttta acaaaaatatt aacgcttaca atttccctgat gcggtatctt 840
 ctcccttagc atctgtgcgg tatttcacac cgcatacgcg gatctgcgca gcaccatggc 900
 ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggg taggtacctt ctgaggcggg aagaaccagc 960
 tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtgaa agtccccagg ctcccagca ggcagaagta 1020
 tgcaaagcat gcactcfaat tagtcagcaa ccagggtggt aaagtccccg ggctcccag 1080
 caggcagaag tatgcaaagc atgcactca attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa 1140
 ctccgcccat ccgcgcccta actccgccca gttccgccca ttctccgcc catggctgac 1200
 taattttttt tatttatgca gaggcgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttcagaagt 1260
 agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct ttgcaaaaa gcttgattct tctgacacaa 1320
 cagtctcgaa cttaaggcta gagccaccat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc 1380
 tcggcccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg 1440
 ctctgatgcc gcctgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac 1500
 cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 1560
 cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgcgctgtc actgaagcgg gaagggactg 1620
 gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca totcaocttg ctccctgccga 1680
 gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc ccgctacctg 1740
 cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcggg tggaagccgg 1800
 tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcgccag ccgaactgtt 1860
 cgcaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg ccaggatctc gtcgtgaccc atggcgatgc 1920
 ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgctttctt ggattcatcg actgtggccg 1980
 gctgggtggt gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 2040
 gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcggcg ctcccgatcc 2100

10

20

30

gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc 2160
 gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgat gcccgcaata aaatatcttt 2220
 attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg atagcgataa ggatccgcgt 2280
 atgggtgact ctcaagtaca tctgtcttga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc 2340
 gcccaacccc gctgacgggc cctgacgggc ttgtctgctc cggcatccg ottacagaca 2400
 agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
 cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
 ggtttcttag acgtcagggt gcaacttttc gggaaatgtg cgcggaacco ctatttgttt 2580
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
 cttttttgcg gcaatttgcc ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 2760
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
 taagatcctt gagagttttc gccccaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 2880
 tctgctatgt ggccggtat tatccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgcgg 2940
 catacastat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 3060
 gcccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaacattt 3240
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
 taaagttgca ggaccacttc tgogctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 3360
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcatgca gcaactgggc cagatggtaa 3420
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 3540
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 3720
 aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgocggatca 3780
 agagctacca actctttttc cgaagtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
 tgttcttcta gtgtagcgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
 ataccctgct ctgctaacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtctgtctt 3960

10

20

30

taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020
 gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 4080
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 4200
 tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatfff tgtgatgctc 4260
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320
 cttttgctgg ccttttgctc acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
 ttattcattg gttatatago ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 4440
 ctatatcata atatgtacat ttatatggc tcatgtccaa tatgacogcc atggtggcat 4500
 tgattattga ctagtatta atagtaatca attacggggc cattagttca tagccatata 4560
 atggagtcc gcgttacata acttacggta aatggccgcg ctggctgacc gcccaacgac 4620
 ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 4680
 cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg 4740
 tatcatatgc caagtcogcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat 4800
 tatgcccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 4860
 atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt 4920
 gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
 caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcy atcgcccgcc ccggtgacgc 5040
 aaatggcggg taggcgtgta cgggtgggag tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
 gtcagatcac tagaagcttt attgoggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
 gtgcttctga cacaacagtc tggaaactaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
 agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
 gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
 attggtctta ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
 tacagctctt aagcctagag tacttaatac gactcaatct aggcctagcct cgagcggcga 5460
 gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgtccc 5520
 tctgggcctc ccagtccctg gcgccccacc acgcctcctc tgtgacagcc gactcctgga 5580
 gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacctg 5640
 cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagt t aatttctatg cctggaagag 5700
 gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcgggaagc 5760

10

20

30

tgtcctgctggg gggcaggccc tgttgggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc cctgcagct 5820
 gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcc cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
 agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
 cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttctcc ggggaaagct 6000
 gaagctgtac acaggggagc cctgcaggac aggggacat catcaccatc accattgat 6059

<210> 209
 <211> 6059
 <212> DNA
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 209
 ctagagtcga cccggggcggc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
 ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
 atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta ttgttaacca ttataagctg caataaacia 180
 gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggaggtt 240
 ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
 ggcgtaaatg cgaagaggcc cgcaccgac gcccttccca acagtgcgc agcctgaatg 360
 gcaaatggac gcgcccgtga gcggcgcat aagcggggc ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
 cgtgaccgt acacttgcca gcgccttagc gcccgctct ttcgctttct tcccttctt 480
 tctcgccacg ttcgcccgt ttcocctca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt 540
 ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaactt gattagggty atggttcacg 600
 tagtgggcca tcgcccgtat agacggtttt tcgccccttg acgttgagat ccacgttctt 660
 taatagtgga ctcttgctcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 720
 tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca 780
 aaaaattaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttccctgat gcggtatttt 840
 ctccctaacg atctgtgctg tatttcacac cgcatacggc gatctgcgca gcaccatggc 900
 ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggt taggtacctt ctgaggcggc aagaaccagc 960
 tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtggtgaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta 1020
 tgc aaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtggt aaagtcccc ggcctccccag 1080
 caggcagaag tatgcaaac atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 1140
 ctccgcccac cccgccccta actccgccc gttccgccc ttctccgccc catggctgac 1200
 taatTTTTTT tatttatgca gaggccgagg ccgctcggc ctctgagcta ttccagaagt 1260

20

30

agtgaggagg ctttttttga ggcctaggct ttigaaaaa gcttgattct tctgaocaaa 1320
 cagtctcgaa ctttaaggcta gagccaccat gattgaacaa gatggattgc acgcagggtc 1380
 tccggccgct tgggtggaga ggcctattcg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg 1440
 ctctgatgcc gccgtgttcc ggcctgcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac 1500
 cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 1560
 cacgaacggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg 1620
 gctgctattg ggcgaagbgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccctg ctccctgccg 1680
 gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gccgctgcat acgcttgatc cggctacctg 1740
 cccattcgac caccacagca aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tgggaagccg 1800
 tcttgtgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcaccg ccgaactggt 1860
 cgcaggctc aaggcgcgca tgcctcagcg cgaggatctc gtcgtgacc atggcgatgc 1920
 ctgcttgcg aatatcatgg tggaaaatgg ccgctttctt ggattcatcg actgtggccg 1980
 gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 2040
 gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgatcc 2100
 gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctgggggtc 2160
 gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgat ggccgcaata aaatatcttt 2220
 attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg atagcgataa ggatccgct 2280
 atggtgcact ctcagtaaaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc cccgacacc 2340
 gccaacacc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 2400
 agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
 cgcgagacga aaggccctcg tgatacgccct atttttatag gtaaatgtca tgataataat 2520
 ggtttcttag acgtcaggtg gcactttctg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 2580
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
 cttttttgcg gcattttgcc ttccgttttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa 2760
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 2880
 totgctatgt ggcgcgggat tatcccgat tgacgcgggg caagagcaac tcggtcggcg 2940
 catacactat tctcagaatg acttgggtga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgotgccata accatgagtg ataacactgc 3060

10

20

30

ggccaactta cttctgacaa cgatecgagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
 catgggggat catgtaactc gcottgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 3240
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 3360
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 3420
 gccctcccgt atcgtagtta totacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt cagaccaagt 3540
 ttactcatal atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcctcttga gatccttttt ttctgcccgt 3720
 aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgcgggatca 3780
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
 tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
 atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtccgtctt 3960
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020
 gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgg aacgacctac accgaactga gatacctaca 4080
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140
 aagcggcagc gtcggaacag gagagcgcac gagggagcct ccagggggaa acgcctggta 4200
 tctttatagt cctgtcgggt ttgcaccct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 4260
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttccctggc 4320
 cttttgctgg ccttttgctc acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
 ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 4440
 ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttggcat 4500
 tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagttca tagccatata 4560
 atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac 4620
 ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 4680
 cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagtg 4740
 tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat 4800
 tatgcccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 4860
 atcgcattta ocattggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt 4920

10

20

30

gactcaccggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
 caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt acaactgcg atgcccgcgc ccgttgacgc 5040
 aatggggcgg taggcgtgta cgggtgggag tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
 gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtoa 5160
 gtgcttctga cacaacagtc tcgaaactaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
 agaagtgggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
 gaccaataga aactgggcctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
 attggtctta ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccaactc ccagttcaat 5400
 tacagctcct aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
 gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggttctc ctgtccctgc tgtcgtctcc 5520
 tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcctc tgtgacagcc gagtcctgga 5580
 gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcag acgggctgta atgaaacctg 5640
 cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 5700
 gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcgggaagc 5760
 tgtcctgcgg ggccaggccc tgttggtcaa ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
 gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcy 5880
 agcccagaag gaagccatct cccctccaga tggggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
 cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttctctc ggggaaagct 6000
 gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggacat catcaccatc accattgat 6059

<210> 210
 <211> 6059
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 210
 cttagagtcga cccgggcggc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
 ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
 atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacia 180
 gttacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggaggtt 240
 ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
 ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgagc agcctgaatg 360

10

20

30

gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
 cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt 480
 tctcgccacg ttgcocggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt 540
 ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattaggggtg atggttcacg 600
 tagtggggca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttgagat ccacgttctt 660
 taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacctcaac cctatctcgg tctattcttt 720
 tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctatctggtta aaaaatgagc tgatttaaca 780
 aaaatttaac gcgaatttta acaaaaatatt aacgcttaca atttcctgat gcggtatttt 840
 ctccttacgc atctgtcggg tattttcacac cgcatacgcg gatctgcgca gcacccatggc 900
 ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggg taggtacctt ctgaggcggg aagaaccagc 960
 tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtgga agtcccagg ctcccacgca ggcagaagta 1020
 tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccca ggctcccag 1080
 caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 1140
 ctccgcccat ccgcgcccta actccgccca gttccgccca ttctccgcc catggctgac 1200
 taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 1260
 agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gcttgattct tctgacacaa 1320
 cagtctcgaa ctaaggcta gagccaccat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc 1380
 tcggcccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg 1440
 ctctgatgcc gcogtgtcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt ttgtcaagac 1500
 cgacctgtcc ggtgccctga atgaaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 1560
 cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg 1620
 gctgctatbg ggogaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcacctg ctccctgccg 1680
 gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg 1740
 ccatttcgac caccacagca aacatcgcat cgagcagca cgtactcggg tgggaagcgg 1800
 tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcgccag ccgaactgtt 1860
 cgcaggctc aaggcgcgca tgcocgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc atggcagatc 1920
 ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg 1980
 gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 2040
 gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac ggtatcgcg ctcccgatcc 2100
 gcagcgcac gcctctctat gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctggggttc 2160
 gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcagat ggccgcaata aaatatcttt 2220

10

20

30

attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg atagcgataa ggatccgcgt 2280
 atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc cccgacaccc 2340
 gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 2400
 agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
 cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
 ggtttcttag acgtcaggty gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 2580
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaagtaaa 2760
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
 taagatcctt gagagttttc gccccaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 2880
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg caagagcaac tcggctcggc 2940
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 3000
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 3060
 ggccaactta cttctgacaa cgtcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
 aaacgacgag cgtgacaoca cgtgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaactatt 3240
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggcctggtta ttgctgataa 3360
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 3420
 gccctcccgat atcgtagtta totacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 3540
 ttactcatat aacttttaga ttgatttaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
 agcgtcagac ccgtagaaa agatcaaagg atctcttga gatccttttt ttctgcgcgt 3720
 aatctgctgc ttgcaaaaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 3780
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
 tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
 atacctcgt ctgctaacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3960
 taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020

10

20

30

gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca 4080
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcctcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggg 4140
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagcct ccagggggaa acgcctggta 4200
 tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 4260
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320
 cttttgctgg ccttttgctc acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
 ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacggtgtat 4440
 ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttgcat 4500
 tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagttoa tagcccatat 4560
 atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggccgcg ctggetgacc gcccaacgac 4620
 ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 4680
 cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccg acttggcagt acatcaagtg 4740
 tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat 4800
 tatgccagtg acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 4860
 atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt 4920
 gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
 caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactgcg atgcccgcg ccgttgacgc 5040
 aaatggggcg taggcgtgta cggtgaggag tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
 gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
 gtgcttctga cacaacagtc tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
 agaagtggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
 gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
 attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
 tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcggcga 5460
 gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgtctcc 5520
 tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgcctcact tgtgacagcc gagtccctga 5580
 gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacctg 5640
 cagcttgaat gagaatatca ctgtccaga caccgacgtt aatttctatg cctggaagag 5700
 gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaaagc 5760
 tgtcctgccc gggcaggccc tgttggctca ctcttccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
 gcatgtggat aaagccgtca gtggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880

10

20

30

agcccagaag gaagccatct cccctccaga tggggctca gctgctccac tccgaacaat 5940
 cactgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttcctcc ggggaaagct 6000
 gaagctgtac acaggggagg cotgcaggac aggggacat catcaccatc accattgat 6059

<210> 211
 <211> 6059
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: plasmid

10

<400> 211
 ctagagtcga cccggggcgc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
 ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
 atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacia 180
 gttaaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat gtgggagggt 240
 ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
 ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 360
 gcgaatggac gcgcctgta gggcgcatc aagcggcgcg ggtgtgtgg ttacgcgcag 420
 cgtgaccgct acacttgcca gcgcctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttctct 480
 tctcgccacg ttcgcccgtt tccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt 540
 ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaactt gattagggtg atggttcacg 600
 tagtgggcca tcgcccgtat agacggtttt tcgccccttg acgttggagt ccacgttctt 660
 taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 720
 tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca 780
 aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgcttaca atttccctgat gcggtatatt 840
 ctccctacgc atctgtgogg tatttcacac cgcatacgcg gatctgcgca gcaccatggc 900
 ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggc taggtacctt ctgaggcggc aagaaccagc 960
 tgtggaatgt gtgtcagtta ggtgtggaa agtccccagc ctccccagca ggcagaagta 1020
 tgcaaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtccccg ggctccccag 1080
 caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 1140
 ctccgcccat ccgccccta actccgccca gttccgccca ttctccgcc catggtgac 1200
 taattttttt tatttatgca gagggcgagg ccgctcggc ctctgageta ttccagaagt 1260
 agtgaggagg cttttttgga ggccataggc tttgcaaaaa gcttgattct tctgacacaa 1320

20

30

cagtctcgaa cttaaggcta gagccaccat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc 1380
tccggccgct tgggtggaga ggtattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg 1440
ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggggc ccggttcttt ttgtcaagac 1500
cgactgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc 1560
cacgaacggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg 1620
gctgtctattg gggaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctccctgccg 1680
gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg 1740
cccattcgac caccaagcga aacatcgcac cgagcagca cgtactcggg tgggaagccg 1800
tcttctgatc caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcaccag ccgaactggt 1860
cgccaggctc aaggcgcgca tgcgccagcg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc 1920
ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg 1980
gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 2040
gcttgggggc gaatgggctg accgcttccct cgtgctttac ggtatcgcg ctcccgatcc 2100
gcagcgcacc gccctctatc gccttcttga cgagtcttc tgagcgggac tctggggttc 2160
gaaatgaccg accaagcgc gcccaacctg ccacacgat ggccgcaata aaatatcttt 2220
atcttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg atagcgataa ggatccgcgt 2280
atggtgcact ctcagtacaa tctgctctga tgcgcacatg ttaagccagc ccgcacccc 2340
gccaaacccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 2400
agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg 2460
cgcgagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
ggtttcttag acgtcagggtg gcacttttcg gggaaatgtg ccgggaaccc ctatctgttt 2580
atctttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 2700
cttttttgcg gcattttgcc ttccgttttt tgcacacca gaaacgctgg tgaaagtaaa 2760
agatgctgaa gatcagttgg gtgcaagagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
taagatcctt gagagtttcc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 2880
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcgggg caagagcaac tcggtcgccc 2940
cacacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatottac 3000
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 3060
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180

10

20

30

aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaaactatt 3240
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 3360
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggc tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 3420
 gccctccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 3540
 ttactcatat atactttaga ttgatttaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
 agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgct 3720
 aatctgtgc ttgcaaaaca aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgcggatca 3780
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggttcagc agagcgcaga taccaaatac 3840
 tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 3900
 atacctcgt ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtctgtct 3960
 taccgggttg gactoaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 4020
 gggttctgac acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 4080
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140
 aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gaggagcct ccagggggaa acgcctggta 4200
 tctttatagt cctgtgggtt ttcgccacct ctgaactgag cgtcgatttt tgtgatgctc 4260
 gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320
 cttttgctgg ccttttgcct acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
 ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat 4440
 ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtocaa tatgaccgcc atgttggcat 4500
 tgattatgta ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat 4560
 atggagttec gcgttacata acttacggta aatggccgc ctggctgacc gcccaacgac 4620
 ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc 4680
 cattgacgct aatgggtgga gtatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagtg 4740
 tatcatatgc caagtccgcc cctattgac gtoaatgacg gtaaattggc gccttggcat 4800
 tatgccagct acatgacott acgggacttt cctacttggc agtacateta cgtattagtc 4860
 atcgtatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt 4920
 gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980

10

20

30

caaaatcaac gggactttcc aaaatgtogt aacaactgcg atcgcccgcc ccggtgacgc 5040
 aaatggggcg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctogt ttagtgaacc 5100
 gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
 gtgcttctga cacaacagto tcgaacttaa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
 agaagtgggt cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
 gaccaataga aactgggctt gtcgagacag agaagactct tgcgttctg ataggcacct 5340
 attggtctta ctgacatcca ctttgccctt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
 tacagctctt aaggctagag tacttaatac gactcactat aggctagcct cgagcgcgga 5460
 gatgggggtg cacgaatgtc ctgcctggct gtggcttctc ctgtccctgc tgtcgtctcc 5520
 tctgggcctc ccagtcctgg gcgcccacc acgctctatc tgtgacagcc gagtctgga 5580
 gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 5640
 cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga caccaaagtt aatttctatg cctggaagag 5700
 gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcgggaagc 5760
 tgtcctgcgg ggccaggccc tgttgggtcaa ctcttccag ccgtgggagc cctgcagct 5820
 gcatgtggat aaagccgtcg agggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
 agcccagaag gaagccatct cccctccaga tgcggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940
 cactgctgac actttccgca aactcttcg agtctactcc aatttctctc ggggaaagct 6000
 gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggaccat catcaccatc accattgat 6059

<210> 212
 <211> 6059
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: plasmid

<400> 212
 ctagagtoga cccgggocggc cgttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg 60
 ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 120
 atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca 180
 gtaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggctc agggggagat gtgggaggt 240
 ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct 300
 ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttcca acagttgcgc agcctgaatg 360
 gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatc aagcggcgcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 420
 cgtgaccgct acacttgcca gcgccctago gcccgctcct ttcgctttct tcccttccct 480

10

20

30

tctcgccacg ttgcgaggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt 540
 cggatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaactt gattaggggtg atggttcaag 600
 tagtggggcca tgcgctgat agacgggttt tgcgctttg acggtggagt ccacgttctt 660
 taatagtggg ctctgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 720
 tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattgggta aaaaatgagc tgatttaaca 780
 aaaatttaac gccaatttta acaaaaatatt aacgcttaca atttcctgat gcggtatatt 840
 ctccctacgc atctgtcggg tatttcacac cgcatacggc gatctcggca gcaccatggc 900
 ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggg taggtacott ctgaggcggg aagaaccagc 960
 tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtggaag agtccccagg ctccccagca ggcagaagta 1020
 tgcaaacgat gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtggt aaagtcccc ggcctccccag 1080
 caggcagaag tatgcaaac atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 1140
 ctccgcccct ccgccccta actccgccc gttccgccc ttctccgccc catggctgac 1200
 taattttttt tatttatgca gaggccagg cgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 1260
 agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct ttgcaaaaa gcttgattct tctgacacaa 1320
 cagtctcga ctaaggcta gagccaccat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc 1380
 tccggccgct tgggtggaga ggcctatcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg 1440
 ctctgatgac ggcgtgttcc ggcgtgcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac 1500
 cgacctgtcc ggtgacctga atgaaactga ggacgaggca gcgaggctat cgtggctggc 1560
 caccgagggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgc actgaagcgg gaagggactg 1620
 gctgctattg ggcgaagtgc cggggcaggg tctcctgtca tctcaccttg ctctgcccga 1680
 gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgag cgggctgcat acgcttgatc cggctacctg 1740
 cccattcgac caccaagcga aacatcgaat cgagcagca cgtactcggg tgggaagcgg 1800
 tcttgtgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcccag ccgaactggt 1860
 cgccaggctc aaggcgcgca tgcgacagg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc 1920
 ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgctttctt ggattcatcg actgtggccg 1980
 gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga 2040
 gcttgggcgc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcggc ctcccgatc 2100
 gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttctt tgagcgggac tctgggggtc 2160
 gaaatgaccg accaagcagc gcccaacctg ccacacagat ggcgcaata aatatcttt 2220
 attttcatca catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg atagcgataa ggatccgct 2280

10

20

30

atggtgcaact ctcagtacaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc cccgacaccc 2340
 gccaacacccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca 2400
 agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaaacg 2460
 cgcgagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca tgataataat 2520
 ggttttcttag acgtcaggtg gcacttttctg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt 2580
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 2640
 tcaataatat tgaaaagga agagtatgag battcaacat tccgtgtcg cccttattcc 2700
 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaaagtaa 2760
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 2820
 taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 2880
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgcgggy caagagcaac tcggtcgcgg 2940
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcaacagaaa agcatcttac 3000
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgcoata accatgagtg ataacactgc 3060
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagj accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa 3120
 catgggggat catgtaactc gcctggtcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 3180
 aaaacgacgag cgtgacacca cgatgctctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaacatt 3240
 aactggcgaa ctacttaact taggttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 3300
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 3360
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggc tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa 3420
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 3480
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggttaactgt cagaccaagt 3540
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 3600
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 3660
 agcgtcagac ccggtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgctt 3720
 aatctgctgc tggcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgcgggatca 3780
 agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaatac 3840
 tgtttcteta gtgtagccgt agtttaggca ccacttcaag aactctgtag cacgcctac 3900
 atacctcgc ctgctaatec tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 3960
 tacggggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg 4020
 gggttcgtgc acacagcca gcttgagcg aacgacctac accgaactga gataacctaca 4080
 gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcctcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 4140

10

20

30

aagcggcagg gtoggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 4200
tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgatddd tgtgatgctc 4260
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 4320
cttttgctgg ccttttgctc acatggctcg acagatcttc aatattggcc attagccata 4380
ttattcattg gttatatagc ataatcaat attggctatt ggccattgca tacgctgtat 4440
ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaocgcc atgttggcatc 4500
tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggc cattagtcca tagccatata 4560
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggccgcg ctggctgacc gcccacgac 4620
ccccgccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccat agggactttc 4680
cattgacgct aatgggtgga gtatctacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagtg 4740
tatcatatgc caagtccgcc cctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgctggcat 4800
tatgccagc acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 4860
atcgcattta coatggtgat gcggttttgg cagtaccacca atgggcgtgg atagcggttt 4920
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 4980
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt acaactgcg atcgccgcc ccgttgacgc 5040
aatggggcg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 5100
gtcagatcac tagaagcttt attgcggtag tttatcacag ttaaattgct aacgcagtca 5160
gtgcttctga cacaacagtc tcgaaact/aa gctgcagtga ctctcttaag gtagccttgc 5220
agaagtggc cgtgaggcac tgggcaggta agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 5280
gaccaataga aactgggctt gtogagacag agaagactct tgcgtttctg ataggcacct 5340
attggtotta ctgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccactc ccagttcaat 5400
tacagctctt aaggctagag taactaatac gactcactat aggctagcct cgagcggga 5460
gatgggggtg cacgaatgct ctgcctggct gtggtttctc ctgtccctgc tgcctctcc 5520
tctgggcctc ccagtcctgg gcgccccacc acgctctatc tgtgacagcc gactcctgga 5580
gaggtacctc ttggaggcca aggaggccga gaatatcacg acgggctgtg ctgaacactg 5640
cagcttgaat gagaatatca ctgtcccaga cacgacgctt aatttctatg cctggaagag 5700
gatggaggtc gggcagcagg ccgtagaagt ctggcagggc ctggccctgc tgtcggaagc 5760
tgtcctcggg ggccaggccc tgttggctca ctcttcccag ccgtgggagc ccctgcagct 5820
gcatgtggat aaagcctcgc agggccttcg cagcctcacc actctgcttc gggctctgcg 5880
agcccagaag gaagccatct cccctccaga tggggcctca gctgctccac tccgaacaat 5940

10

20

30

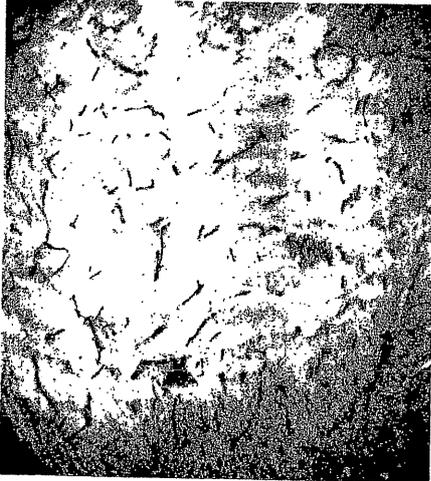
caatgctgac actttccgca aactcttccg agtctactcc aatttcctcc ggggaaagct 6000
gaagctgtac acaggggagg cctgcaggac aggggacat catcaccatc accattgat 6059

10

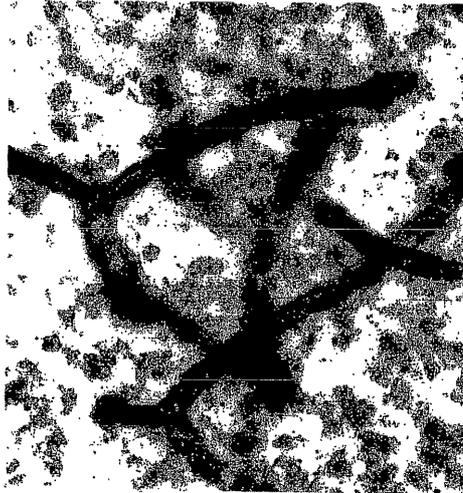
20

30

【 図 1 】



【 図 2 】



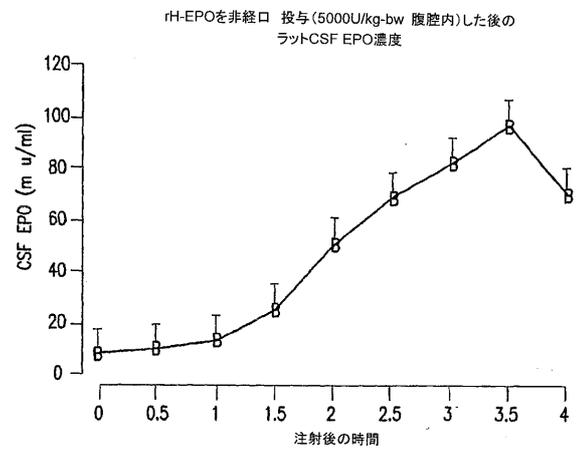
【 図 3 】



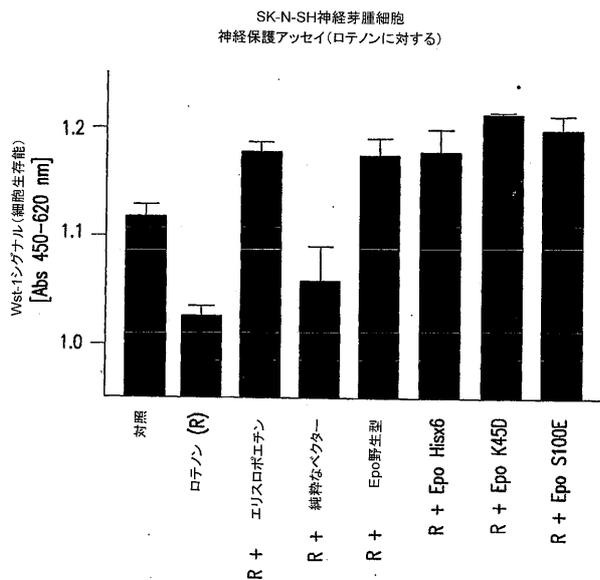
【 図 4 】



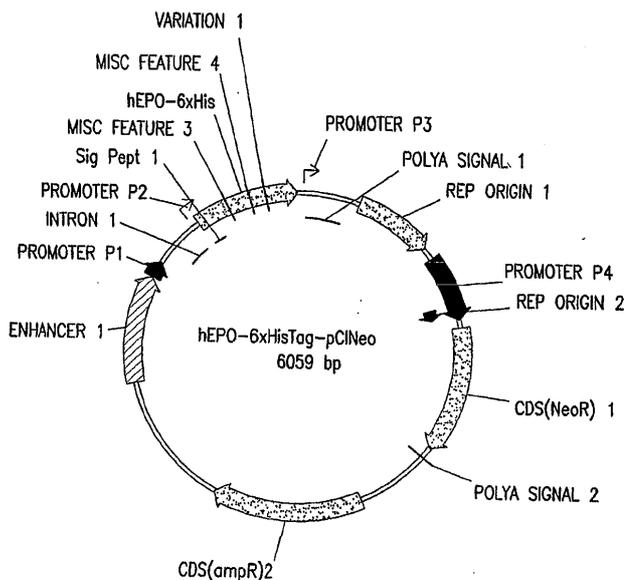
【 図 5 】



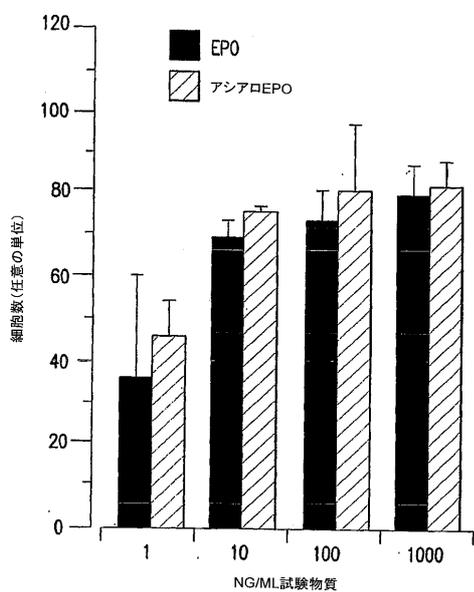
【 図 6 A 】



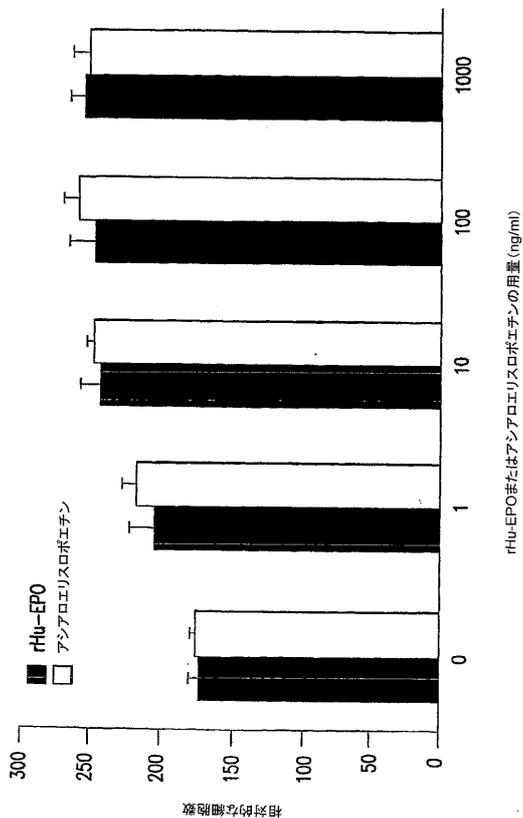
【 図 6 B 】



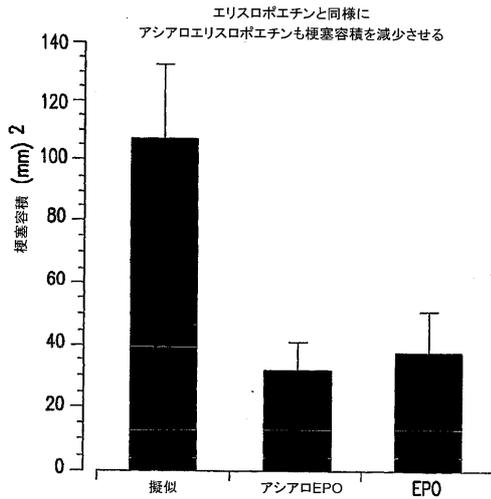
【 図 7 】



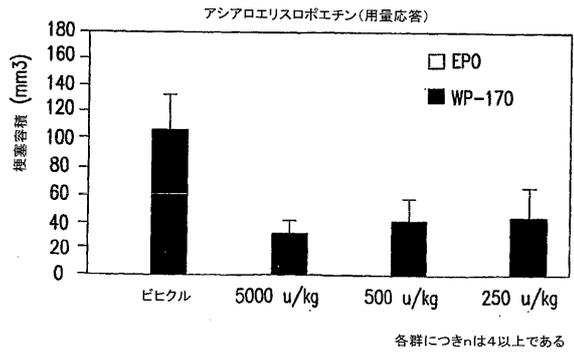
【 図 8 】



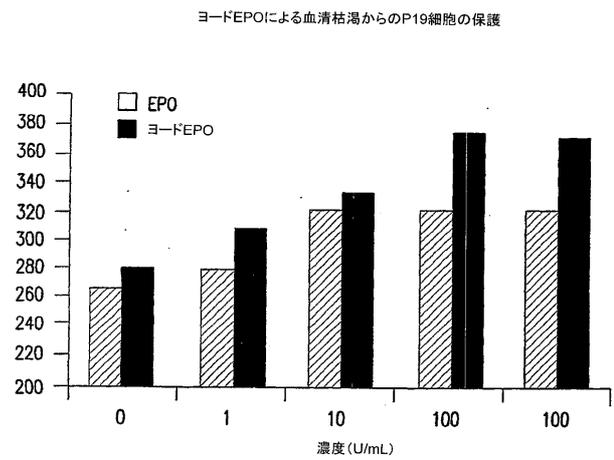
【 図 9 】



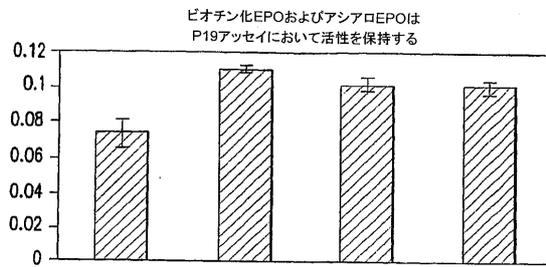
【 図 10 】



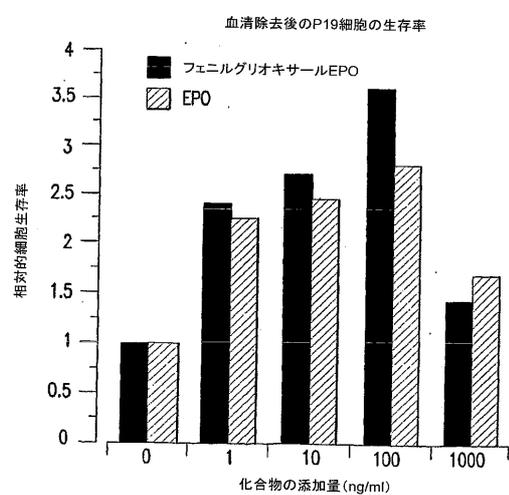
【 図 11 】



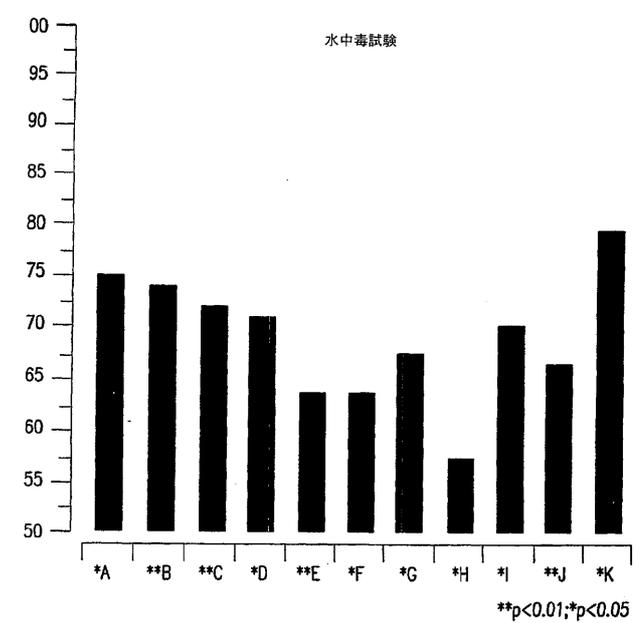
【 図 12 】



【 図 13 】

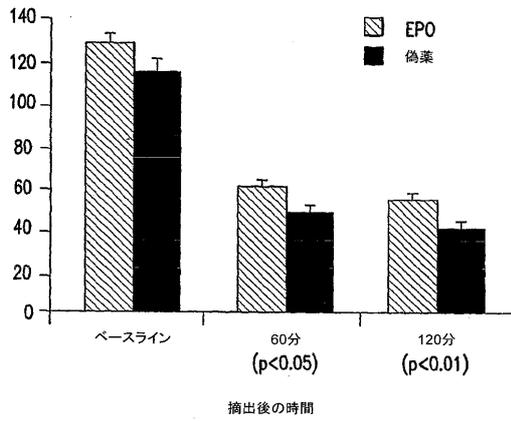


【 図 14 】



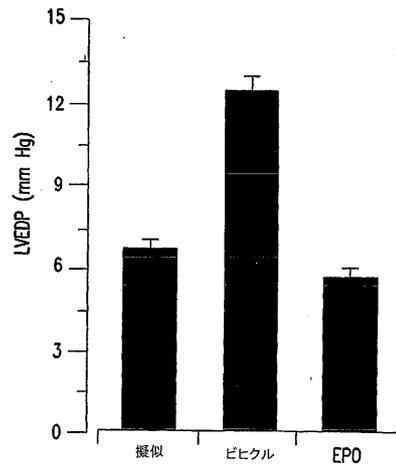
【 図 1 5 】

エリスロポエチンは移植用に摘出した心臓の心機能を改善する

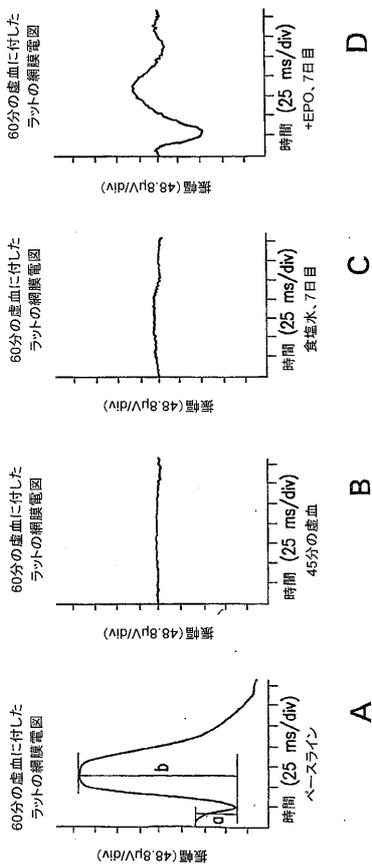


【 図 1 6 】

30分の産血後7日目のラット心臓

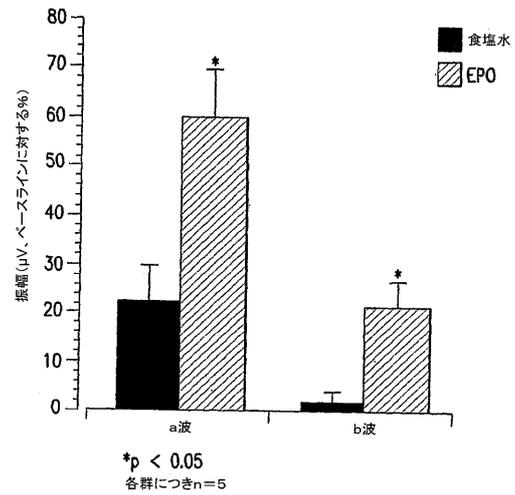


【 図 1 7 】

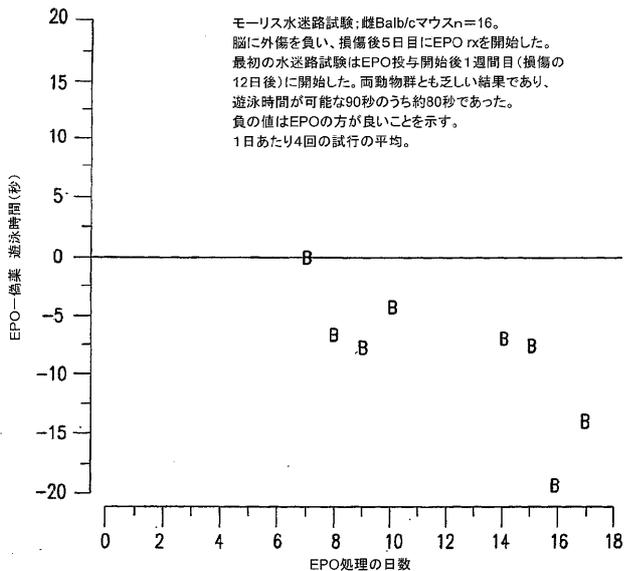


【 図 1 8 】

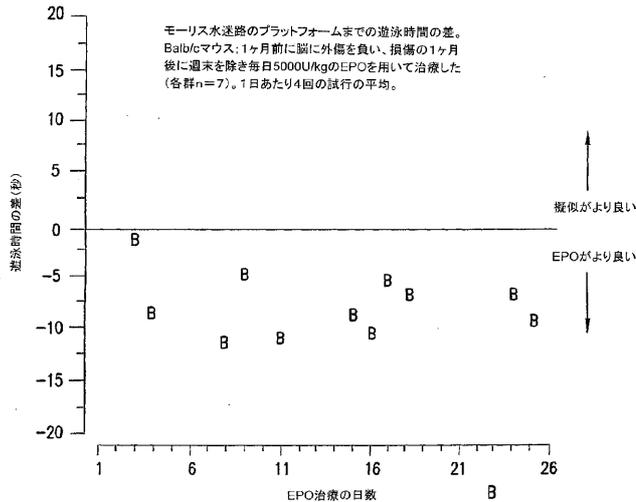
60分産血後の網膜電図の振幅



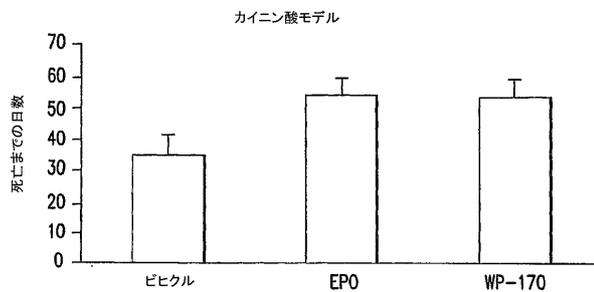
【 図 19 】



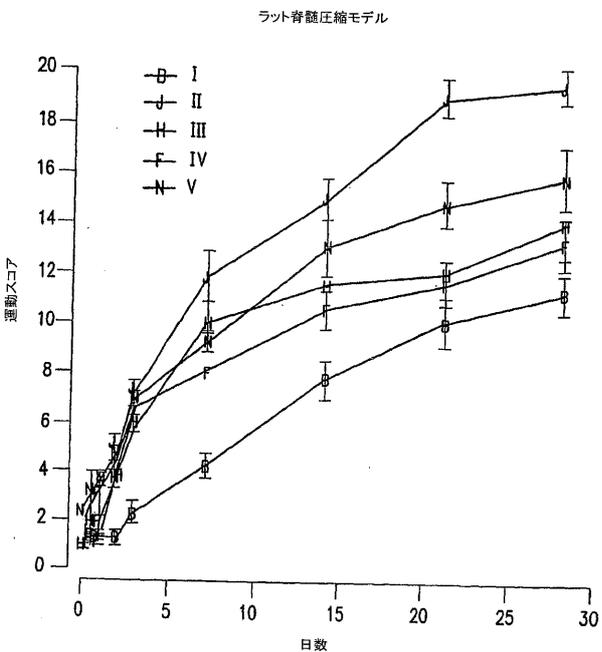
【 図 20 】



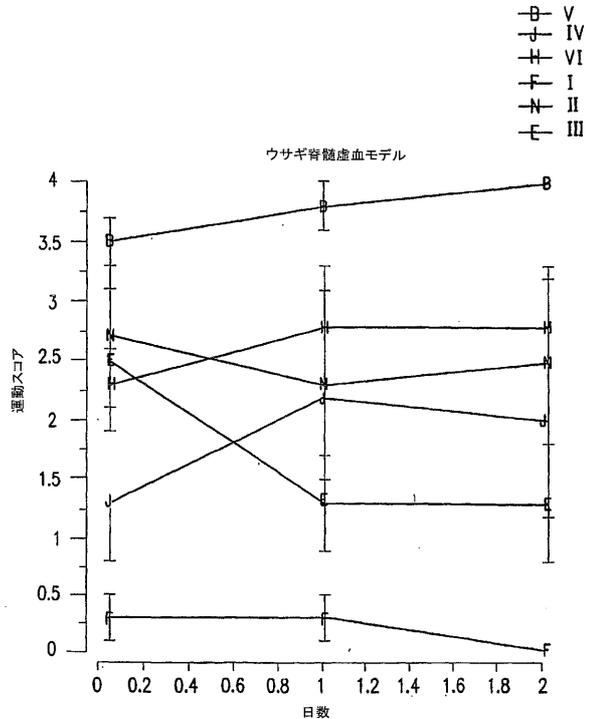
【 図 21 】



【 図 22 】



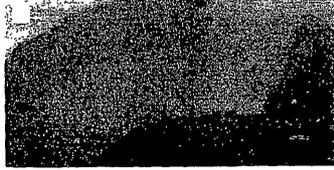
【 図 23 】



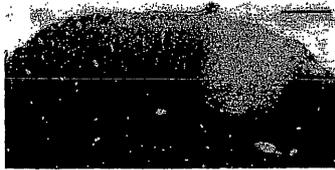
【 図 2 4 】



A

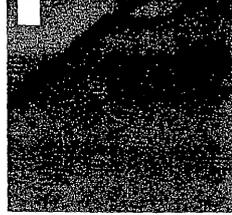


B

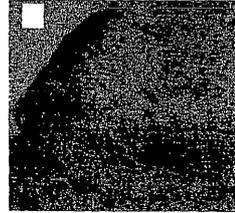


C

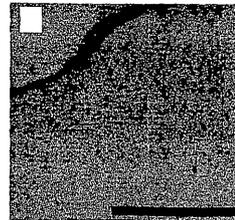
【 図 2 5 】



A

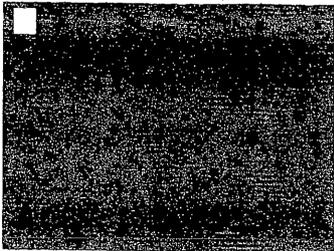


B

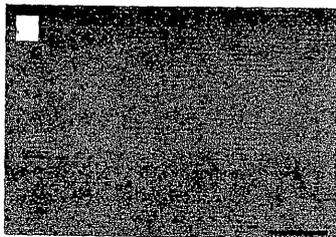


C

【 図 2 6 】

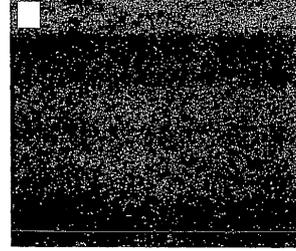


A

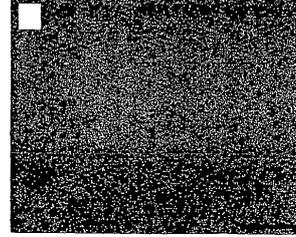


B

【 図 2 7 】

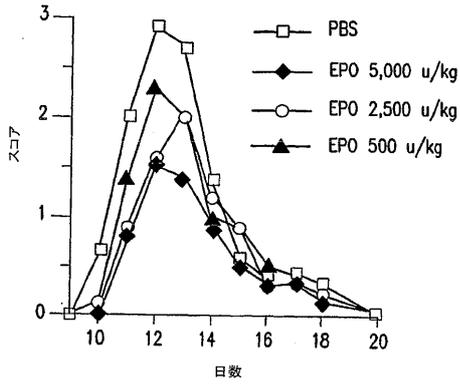


A

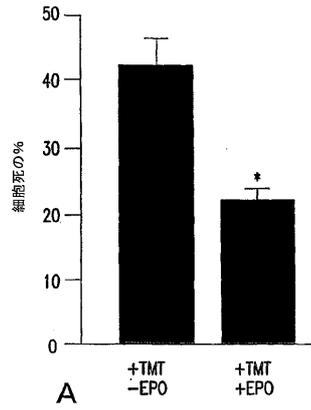


B

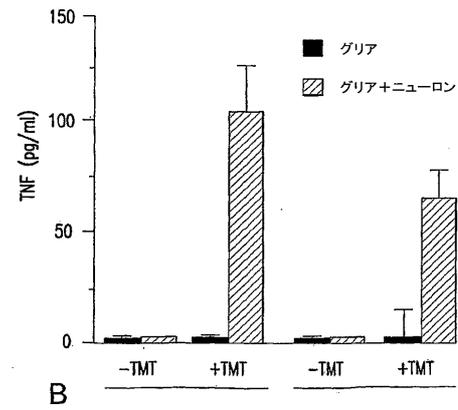
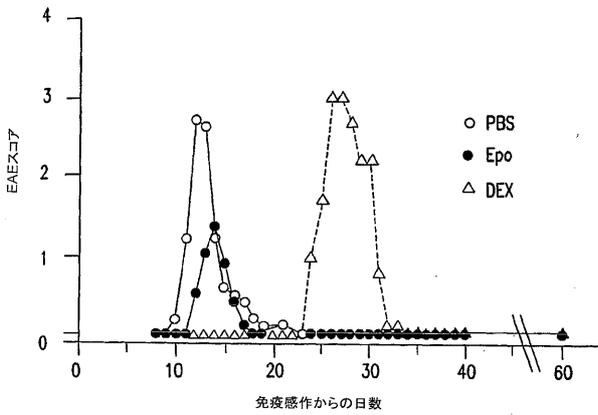
【 図 2 8 】



【 図 3 0 】

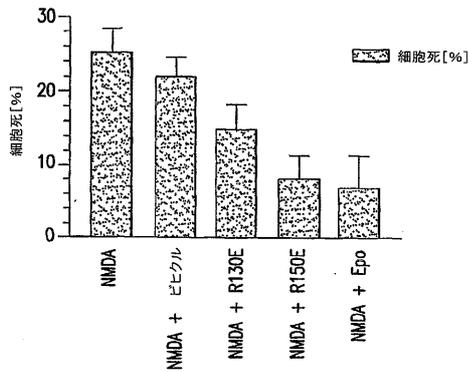


【 図 2 9 】

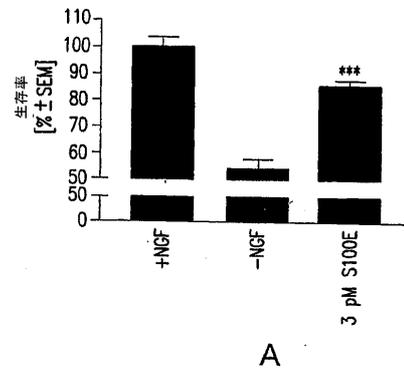


【 図 3 1 】

初代海馬神経細胞におけるNMDA誘導細胞死
5nMの化合物

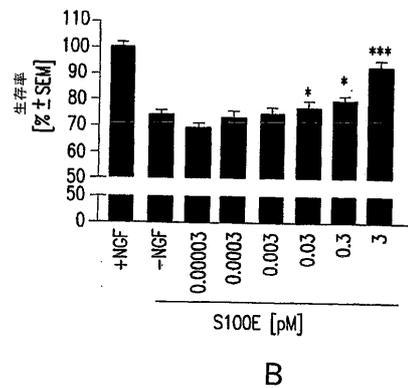
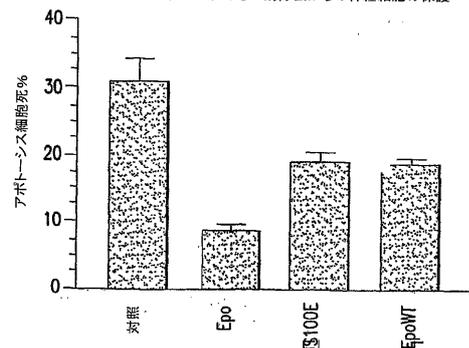


【 図 3 3 】

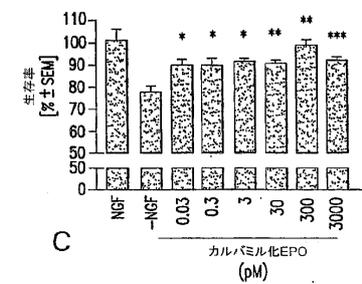
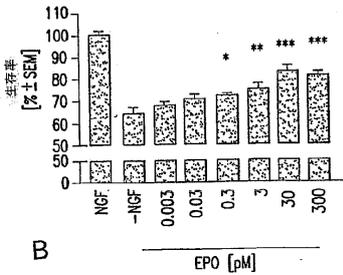
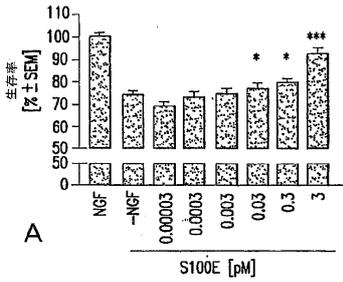


【 図 3 2 】

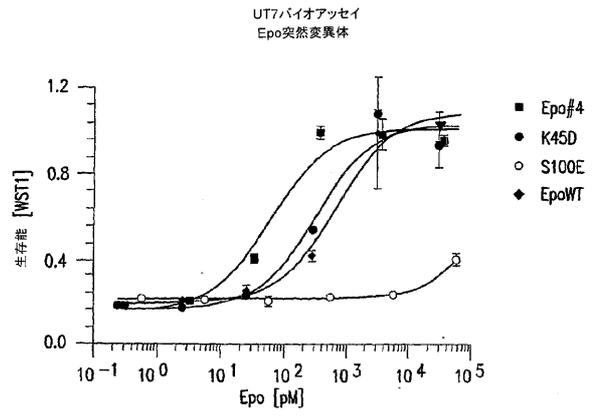
P19細胞における血清除去からの神経細胞の保護



【 図 3 4 】

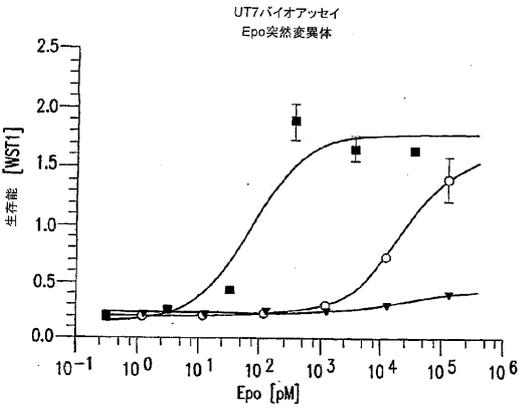


【 図 3 5 】



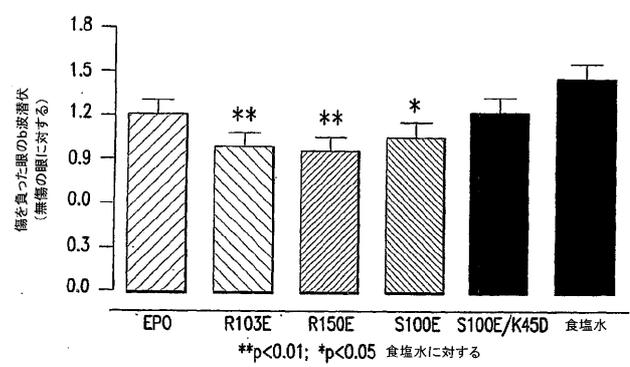
	Epo#4	K45D	S100E	EpoWT
EC50	58.13	294.0	5.3840e+006	608.0

【 図 3 6 】

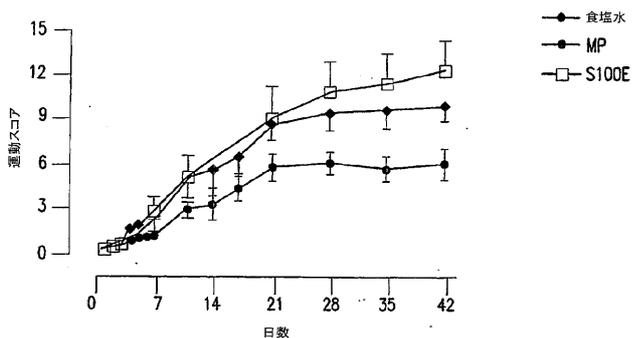


EC50 [pM]	Epo#4	R103E	R150E
	66.5	21760	20450

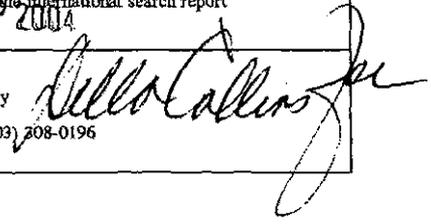
【 図 3 8 】



【 図 3 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/20964										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : G01N 33/53; C12N 5/00, 15/00; A61K 38/00 US CL : 530/350, 397; 435/69.1, 320.1, 325; 514/2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. :												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Please See Continuation Sheet												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STIC sequence search including databases such as Geneseq, Issue Patents AA, SwissProt												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	WEN et al. Erythropoietin Structure-Function Relationships. The Journal of Biological Chemistry. September 1994, Vol. 269. No. 36, pages 22839-22846, entire reference, especially Table I.	1-10, 12, 13, 45-47, 49, 50										
Y	BOISSEL et al. Erythropoietin Structure-Function Relationships. The Journal of Biological Chemistry. July 1993, Vol. 268. No. 21, pages 15983-15993, entire reference, especially abstract and Table II.	1-10, 12, 13, 45-47, 49, 50										
Y	ELLIOTT et al. Mapping of the Active Site of Recombinant Human Erythropoietin. Blood. January 1997, Vol. 89. No. 2, pages 493-502, entire reference, especially Table I	1-10, 12, 13, 45-47, 49, 50										
Y	US 5,856,298 A (STRICKLAND) 05 January 1999 (05.01.1999), abstract; column 3, lines 20-47; column 6, lines 26-39; column 8, lines 13-50.	1, 16-24, 51-58, 66										
X	US 5,604,198 A (PODUSLO et al.) 18 February 1997 (18.02.1997), column 1, lines 48-63; column 6, lines 23-32; column 14, line 35-column 15, line 51 and lines 54-68; column 16, lines 53-63 and column 17, lines 27-58.	59-68										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" documents member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" documents member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" documents member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 16 August 2004 (16.08.2004)		Date of filing of the international search report 07 SEP 2004										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Regina M. DeBerry  Telephone No. (703) 308-0196										

PCT/US03/20964

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 2:

WEST keywords include: EPO, erythropoietin, mtein, asialoerythropoietin, acylation or aceylated, succinylation or succinyated or carbamylation or carbamylated

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P 9/02 (2006.01)	A 6 1 P	9/02	
A 6 1 P 9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	1 0 1
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 P	39/02	
C 0 7 K 14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52	Z N A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	E
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A

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

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72) 発明者 ニールセン, ヤコブ

デンマーク国 デーカー - 1 6 6 0 コペンハーゲン, 1 . テーハー . , ダンネプログスガーデ 1 7

(72) 発明者 ベダーセン, ヤン, トーライフ

デンマーク国 デーカー - 2 7 0 0 ブロンシェ, 1 , ホルクス ブラツ 1 4

(72) 発明者 ガーヴィン, イェンス

デンマーク国 デーカー - 2 1 0 0 コペンハーゲン, 1 . テーフェー, イーイアラルツガーデ 5 2

(72) 発明者 パイ, カトリン

デンマーク国 デーカー - 2 1 0 0 コペンハーゲン, 2 . テーハー, アラースガーデ 1

(72) 発明者 ベダーセン, ラース, オスターガールド

デンマーク国 デーカー - 2 4 0 0 コペンハーゲン, フェド フィヘン 1 4

(72) 発明者 ライスト, マルセル

デンマーク国 デーカー - 2 5 0 0 ファルビー, 1 , クロエファールブラツガーデ 1 4

(72) 発明者 ガイスト, マリー, アーファン

デンマーク国 デーカー - 2 5 0 0 ファルビー, サクストルフスフェーグ 4 4

(72) 発明者 カルンキ, ペッカ

デンマーク国 デーカー - 2 1 0 0 コペンハーゲン, 3 . テーハー, クラッセンガーデ 1 7

(72) 発明者 クリステンセン, ソレン

- デンマーク国 デーカー - 4 0 4 0 イリンヘ, リストバーデフェイ 3 2
 (72)発明者 サガー, トーマス
 デンマーク国 デーカー - 2 4 6 5 スモルム, ストルモセフェイ 3 5
 (72)発明者 ブラインズ, マイケル
 アメリカ合衆国 0 6 5 2 5 コネティカット州, ウッドブリッジ, ウェパウオーグ ロード 1
 (72)発明者 セラミ, アンソニー
 アメリカ合衆国 1 0 5 2 0 ニューヨーク州, クロトン - オン - ハドソン, ブランブルブッシュ
 ドライブ 4 9
 (72)発明者 セラミ, カーラ
 アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州, スリーピー ホーロー, ファーリントン アベニ
 ュー 1 2 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA21 CA01 GA11 HA01
 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
 4C084 AA01 AA02 AA13 AA17 BA02 BA08 BA35 DC10 NA14 ZA531
 ZA541
 4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA02 ZA16 ZA33 ZA36 ZA39 ZA40
 ZA43 ZA53 ZA54 ZB08 ZB26 ZB35 ZC35
 4H045 AA10 BA10 BA53 CA40 DA13 EA20 FA74

专利名称(译)	重组组织保护性细胞因子和编码其的核酸用于保护，恢复和增强响应细胞，组织和器官		
公开(公告)号	JP2006507228A	公开(公告)日	2006-03-02
申请号	JP2004518233	申请日	2003-07-01
[标]申请(专利权)人(译)	朗德贝克公司		
申请(专利权)人(译)	肯尼斯ES沃伦研究所有限公司 哈.Lundbeck公司AH / ES		
[标]发明人	ニールセンヤコブ ペダーセンヤントーライフ ガーヴィンイエンス バイカトリン ペダーセンラスオスターガールド ライストマルセル ガイストマリーアーファン カルンキベッカ クリステンセンソレン サガートーマス ブラインズマイケル セラミアンソニー セラミカーラ		
发明人	ニールセン,ヤコブ ペダーセン,ヤン,トーライフ ガーヴィン,イエンス バイ,カトリン ペダーセン,ラス,オスターガールド ライスト,マルセル ガイスト,マリー,アーファン カルンキ,ベッカ クリステンセン,ソレン サガー,トーマス ブラインズ,マイケル セラミ,アンソニー セラミ,カーラ		
IPC分类号	A61K38/00 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/02 A61P9/04 A61P9/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/06 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P39/02 C07K14 /52 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N15/09 C12N5/10 C07K14/505 C12N5/00 C12N15 /00 C12N15/87 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/06 C07K14/505 C07K2319/00 C12N15/87		
FI分类号	A61K37/02 A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/02 A61P9/04 A61P9/10 A61P25/00.101 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/06 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P39/02 C07K14/52.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.E C12N15/00.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA21 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA35 4C084/DC10 4C084/NA14 4C084/ZA531 4C084/ZA541 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA16 4C086/ZA33 4C086/ZA36		

4C086/ZA39 4C086/ZA40 4C086/ZA43 4C086/ZA53 4C086/ZA54 4C086/ZB08 4C086/ZB26 4C086/ZB35 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA13 4H045/EA20 4H045/FA74

優先権 60/392455 2002-07-01 US
60/393423 2002-07-03 US

外部链接 Espacenet

摘要(译)

本发明提供了通过全身或局部施用促红细胞生成素受体活性调节剂(例如)来保护或增强包括人在内的哺乳动物体内,原位或离体的反应性细胞,组织,器官或身体部分功能或生存力的方法和组合物。作为重组组织保护性细胞因子。

細胞、組織又は器官	機能障害又は病理	症状又は疾患	タイプ	
心臓	虚血	冠状動脈疾患	急性、慢性、 不安定、不安定 トレスラ-筋様群	
		心筋梗塞		
		アングINA		
		先天性心疾患	弁膜性、心筋症	
		アリンスタタル型狭心症		
		心臓破裂	動脈瘤性 鼻中隔穿孔	
		血管炎		
	不整脈	頸脈、房室不整脈、 上室性、心室性、 伝導異常	不安定、不安定、 過敏性頸動脈洞節	
	ラウ血性心不全	左心室、右心室、両心室、 収縮期性、拡張期性	心筋症(特異性アレルギー、 感染性、代謝性、放射線、 不全症、結合組織障害、 過労及び内痔腫、神経 血管性等) 自己免疫性、感染、 突発性	
		心筋炎		
	肺性心			
	鈍傷及び穿通損傷			
	毒素	コカイン中毒		
血管	高血圧症	原発性、続発性		
	凝固病			
	線維筋過形成			
	動脈瘤	解離性、破裂性、拡大性		
肺	閉塞	喘急、 慢性気管支炎、 気腫及び気道閉塞		
	虚血性肺疾患	肺動脈硬化症、 肺動脈血栓症、 肺動脈圧症		
	環境肺疾患			
	虚血性肺疾患	肺動脈硬化症		
	間質性肺疾患	肺動脈血栓症		
	先天性	特異性肺線維症		
	肺性心	肺性心線維症		
	外傷			
	肺炎及び肺炎質炎	感染性、寄生性、毒性、 外傷性、心筋、吸引		
	サルコイドーシス			
	脾臓	内分泌	真性糖尿病型及びII型	ベータ細胞の不全、機能 障害、 糖尿病性神経障害
			脾臓の他の内分泌細胞 不全	
外分泌		脾臓外分泌不全	脾炎	