

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003 - 528611

(P2003 - 528611A)

(43) 公表日 平成15年9月30日 (2003.9.30)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テラコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/711	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/711		45/00	4 B 0 6 4
38/00		A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 5
45/00		3/04	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全177数) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001 - 570751 (P2001 - 570751)

(86) (22) 出願日 平成13年3月28日 (2001.3.28)

(85) 翻訳文提出日 平成14年9月27日 (2002.9.27)

(86) 国際出願番号 PCT/US01/09999

(87) 国際公開番号 W001/073034

(87) 国際公開日 平成13年10月4日 (2001.10.4)

(31) 優先権主張番号 60/192,654

(32) 優先日 平成12年3月28日 (2000.3.28)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 60/199,211

(32) 優先日 平成12年4月24日 (2000.4.24)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 アムジェン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320,
サウザンド オークス, ワン アムジェ
ン センター ドライブ

(72) 発明者 パスティー, クリストファー ジェイ.
アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 93003,
ベンチュラ, ウェストリッジ ドライブ
1027

(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 様糖タンパク質ホルモンのポリペプチドおよびヘテロ二量体

(57) 【要約】

新規な 10ポリペプチドおよびそのヘテロ二量体、ならびにそれをコードする核酸分子が本明細書において開示される。本発明によってまた、ベクター、宿主細胞、選択的結合因子、ならびに 10ポリペプチドおよびそのヘテロ二量体形態、特に 2 / 10を生成する方法が提供される。 10ポリペプチドおよび 2 / 10ヘテロ二量体またはその各々の結合因子を用いた疾患の処置、診断、改善または予防のための方法がまた、本発明によって提供される。

ヒト糖タンパク質ホルモンβ10ポリペプチド

ヒト糖タンパク質ホルモンβ10ポリペプチド核酸塩酸塩

```

ATGAGCTGGCAATTCCTCTCTGGCCGCGCCGCTCCCTCTGCG
TGGCGATGGCTGTGATCTGGCTGCGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
GGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
AGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
GGGAAACCCATTCCTGGAAACCCGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
GTACTTCAACCGACCGACCGACCGACCGACCGACCGACCGACCGACCG
CGGCGATGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
CGGCGATGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
AGCTGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT

```

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号2に記載のヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) (a)または(b)の相補体に対して、中程度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされたポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(d) (a)～(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項2】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号1に記載のポリペプチドに対して、少なくとも約70、75、80、85、90、95、96、97、98、または99%同一であるポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列であって、ここで該ポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2に記載のヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされたポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 配列番号2、(a)、または(b)のヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は、少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードし、ここで該ポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) 配列番号2、または(a)～(c)のヌクレオチド配列であって、少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、ヌクレオチド配列；

(e) (a) ~ (d) のいずれかの相補体に対して、中程度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされたポリペプチドは、ヒト 2 ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10 ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項3】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号1に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2 ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10 ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号1に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2 ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10 ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号1に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2 ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10 ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端および/またはN末端短縮を有する、配列番号1に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2 ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10 ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) 配列番号1に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は、以下：アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有し、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2 ポリペプチドに対してヘテロ二量

体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)~(e)のヌクレオチド配列；

(g) (a)~(f)のいずれかの相補体に対して、中程度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされたポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(h) (a)~(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項4】 請求項1、2、または3に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】 真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】 原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】 10ポリペプチドを生成するプロセスであって、該ポリペプチドを発現するのに適切な条件下で請求項5に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて該培養物から該ポリペプチドを単離する工程、を包含する、プロセス。

【請求項9】 請求項8に記載のプロセスによって生成される、ポリペプチド。

【請求項10】 請求項8に記載のプロセスであって、前記核酸分子が、前記10ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された、ネイティブな10ポリペプチドのためのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

【請求項11】 請求項2に記載の単離された核酸分子であって、前記パーセント同一性が、以下：GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、B

LASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。

【請求項12】 化合物が10ポリペプチドの活性または産生を調節するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項4に記載のベクターを含む細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞中の10ポリペプチドの活性または産生を測定する工程、を包含する、プロセス。

【請求項13】 配列番号3のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項14】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号3に記載の成熟アミノ酸配列であって、残基1に成熟アミノ末端を含み、必要に応じてさらに、アミノ末端メチオニンを含む、成熟アミノ酸配列；

(b) 配列番号3のオルソログのアミノ酸配列であって、該コードされたポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 配列番号3のアミノ酸配列に対して、少なくとも約70、75、80、85、90、95、96、97、98、または99%同一であるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を有する、配列番号3のアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで該ポリペプチドが、ヒト2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列のフラグメント；

(e) 配列番号3のアミノ酸配列、または(a)~(c)の少なくとも1つのいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

単離されたポリペプチド。

【請求項15】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号3に記載のアミノ酸配列であって、該ポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号3のアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号3のアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端および/またはN末端短縮を有する、配列番号3のアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) 配列番号3のアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列は、以下：アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有し、ここで該ポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドに対してヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

、からなる群より選択されたアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項16】 請求項1、2または3に記載の核酸分子によってコードされた、単離されたポリペプチド。

【請求項17】 請求項14に記載の単離されたポリペプチドであって、前記パーセント同一性が、以下：GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。

【請求項18】 配列番号3のアミノ酸配列を含むペプチドを用いて動物を免疫することによって生成された、抗体。

【請求項19】 請求項13、14、または15に記載のポリペプチドに特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項20】 モノクローナル抗体である、請求項19に記載の抗体。

【請求項21】 配列番号3のアミノ酸配列を含むペプチドに結合するモノクローナル抗体を生成する、ハイブリドーマ。

【請求項22】 請求項13、14、または15に記載のポリペプチドに特異的に結合する、抗10抗体またはそのフラグメントを用いて、10ポリペプチドの量を検出または定量する方法。

【請求項23】 少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する選択的結合因子またはそのフラグメントであって、該ポリペプチドが、以下

(a) 配列番号3のアミノ酸配列；および

(b) 配列番号3のアミノ酸配列のフラグメント；および

(c) (a)または(b)の天然に存在する改変体、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項24】 抗体またはそのフラグメントである、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項25】 ヒト化抗体である、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項26】 ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項27】 ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項28】 モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項29】 キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項30】 CDR移植抗体またはそのフラグメントである、請求項2

3に記載の選択的結合因子。

【請求項31】 抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項32】 可変領域フラグメントである、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項33】 FabフラグメントまたはFab'フラグメントである、請求項23に記載の可変領域フラグメント。

【請求項34】 配列番号3のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する特異性を有する少なくとも1つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項35】 検出可能な標識に結合している、請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項36】 10ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する請求項23に記載の選択的結合因子。

【請求項37】 疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための方法であって、請求項23に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項38】 甲状腺関連の疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための方法であって、請求項23に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項39】 請求項3のアミノ酸配列を含むポリペプチドを用いて動物を免疫することによって生成される、選択的結合因子。

【請求項40】 請求項1、2、または3に記載のポリペプチドに結合し得る選択的結合因子を生成する、ハイブリドーム。

【請求項41】 請求項13、14、または15に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項42】 請求項41に記載の組成物であって、前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項41に記載の組成物。

【請求項43】 前記ポリペプチドが、配列番号3に記載の成熟アミノ酸配列を含む、請求項41に記載の組成物。

【請求項44】 請求項13、14、または15に記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項45】 水溶性ポリマーで共有結合的に改変されている、請求項44に記載のポリペプチド。

【請求項46】 請求項45に記載のポリペプチドであって、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項47】 請求項1、2または3に記載の核酸分子、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項48】 前記核酸分子が、ウイルスベクターに含まれる、請求項47に記載の組成物。

【請求項49】 請求項1、2、または3に記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項50】 異種アミノ酸配列に融合した、請求項13、14または15に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項51】 前記異種アミノ酸配列が、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項50に記載の融合ポリペプチド。

【請求項52】 医学的状態を処置、予防、または改善するための方法であって、請求項13、14、もしくは15に記載のポリペプチド、または請求項1、2もしくは3に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項53】 被験体において、病的状態、または病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 請求項13、14、もしくは15に記載のポリペプチド、または請求項

1、2、もしくは3に記載の核酸分子によってコードされたポリペプチドの発現の、サンプル中における存在または量を決定する工程；および

(b) 該ポリペプチドの発現の存在または量に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性を診断する、工程、
を包含する、方法。

【請求項54】 被験体において、甲状腺に関連した病的状態または甲状腺に関連した病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 請求項13、14、もしくは15に記載のポリペプチド、または請求項1、2、もしくは3に記載の核酸分子によってコードされたポリペプチドの発現の、サンプル中における存在または量を決定する工程；および

(b) 該ポリペプチドの発現の存在または量に基づいて、甲状腺に関連した病的状態または甲状腺に関連した病的状態に対する感受性を診断する工程、
を包含する、方法。

【請求項55】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適切な膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項13、14、または15に記載のポリペプチドを分泌する、細胞、
を備え、

ここで該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に対して有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項56】 ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項13、14、または15に記載のポリペプチドを化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対するポリペプチドの結合の程度を決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項57】 動物において、ポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項1、2、または3に記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項58】 請求項1、2、または3に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項59】 ヒト 10ポリペプチドおよびヒト 2ポリペプチドのヘテロ二量体。

【請求項60】 請求項59に記載の 2 / 10ヘテロ二量体の天然に存在する改変体。

【請求項61】 ヒト 10ポリペプチドおよびヒト 2ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、ベクター。

【請求項62】 請求項61に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項63】 原核生物細胞である、請求項62に記載の宿主細胞。

【請求項64】 真核生物細胞である、請求項62に記載の宿主細胞。

【請求項65】 2 / 10ヘテロ二量体を生成するプロセスであって、該 2 / 10ヘテロ二量体を発現するのに適切な条件下で、請求項62に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて該培養物から該 2 / 10ヘテロ二量体を単離する工程、を包含する、プロセス。

【請求項66】 請求項65に記載のプロセスによって生成されるヘテロ二量体。

【請求項67】 化合物が 2 / 10ヘテロ二量体の活性または産生を調節するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項62に記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞中の、 2 / 10ヘテロ二量体の活性または産生を測定する工程、を包含する、プロセス。

【請求項68】 ヒト 2 / 10ヘテロ二量体を用いて動物を免疫することによって生成される、抗体。

【請求項69】 請求項59に記載の 2 / 10ヘテロ二量体またはその天然に存在する改変体に特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項70】 モノクローナル抗体である、請求項69に記載の抗体。

【請求項71】 2 / 10ヘテロ二量体に特異的である、請求項70に記載のモノクローナル抗体を生成する、ハイブリドーマ。

【請求項72】 請求項69に記載の抗体を用いて、 2 / 10ヘテロ二

量体の量を検出または定量する、方法。

【請求項73】 選択的結合因子またはそのフラグメントであって、該選択的結合因子またはそのフラグメントは、以下：

(a) 請求項59に記載の 2 / 10ヘテロ二量体；

(b) 請求項59に記載の 2 / 10ヘテロ二量体のフラグメント；および

(c) (a)または(b)の天然に存在する改変体、

のうち少なくとも1つに特異的に結合する、

選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項74】 抗体またはそのフラグメントである、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項75】 ヒト化抗体である、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項76】 ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項77】 ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項78】 モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項79】 キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項80】 CDR移植抗体またはそのフラグメントである、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項81】 抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項82】 可変領域フラグメントである、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項83】 FabフラグメントまたはFab'フラグメントである、請求項82に記載の可変領域フラグメント。

【請求項84】 ヒト 2 / 10ヘテロ二量体に対して特異性を有する少なくとも1つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント

。

【請求項85】 検出可能標識に結合している、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項86】 2 / 10ヘテロ二量体の生物学的活性を拮抗する、請求項73に記載の選択的結合因子。

【請求項87】 疾患、状態、または障害を処置、予防、または改善するための方法であって、請求項59に記載の2 / 10ヘテロ二量体、あるいは該ヘテロ二量体、またはそのフラグメントもしくは天然に存在する改変体に特異的に結合する選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程、を包含する、方法。

【請求項88】 甲状腺に関連した疾患、状態、または障害を処置、予防、または改善するための方法であって、請求項59に記載の2 / 10ヘテロ二量体、あるいは該ヘテロ二量体、またはそのフラグメントもしくは天然に存在する改変体に特異的に結合する選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程、を包含する、方法。

【請求項89】 組成物であって、請求項59に記載のヘテロ二量体、または該ヘテロ二量体の天然に存在する改変体、または該ヘテロ二量体のフラグメント、または前述のいずれかの選択的結合因子、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項90】 前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項89に記載の組成物。

【請求項91】 動物において2 / 10ヘテロ二量体のレベルを調節する方法であって、請求項1、2、または3に記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項92】 水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変されている、請求項59に記載のヘテロ二量体またはその天然に存在する改変体。

【請求項93】 請求項92に記載のヘテロ二量体であって、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレ

ンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ヘテロ二量体。

【請求項94】 融合ポリペプチドであって、異種アミノ酸配列に融合された、請求項59に記載のヘテロ二量体またはその天然に存在する改変体を含む、融合ポリペプチド。

【請求項95】 請求項94に記載の融合ポリペプチドであって、前記異種アミノ酸配列が、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントである、融合ポリペプチド。

【請求項96】 被験体において病的状態、または病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 請求項59に記載のヘテロ二量体またはその天然に存在する改変体の発現の存在または量を決定する工程；および

(b) 該ヘテロ二量体の発現の存在または量に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

【請求項97】 被験体において、甲状腺に関連した病的状態または甲状腺に関連した病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 請求項59に記載のヘテロ二量体またはその天然に存在する改変体の発現の存在または量を決定する工程；および

(b) 該ヘテロ二量体の発現の存在または量に基づいて、甲状腺に関連した病的状態または甲状腺に関連した病的状態に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

【請求項98】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適切な膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項59に記載の2/10ヘテロ二量体またはその天然に存在する改変体を分泌する、細胞、を備え、

該膜は、該ヘテロ二量体に対して透過性であり、そして該細胞に対して有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項99】 ヘテロ二量体に結合する化合物を同定する方法であって、
以下：

(a) 請求項59に記載のヘテロ二量体またはその天然に存在する改変体を化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該ヘテロ二量体の結合の程度を決定する工程、
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、2000年4月24日付け出願の米国仮特許出願番号60/199,211および2000年3月28日付け出願の米国仮特許出願番号60/192,654の利益を主張する、2000年11月27日付特許出願の米国特許出願番号09/723,970の一部継続出願である。これらは、本明細書中において参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、糖タンパク質ホルモンファミリーの新規な 様メンバー（本明細書中において、「ベータ() - 10」または「 10」という）およびこのメンバーをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、サブユニットとして - 10および - 2を含む、新規なヘテロ二量体性糖タンパク質ホルモンに関する。本発明はまた、 - 10ポリペプチドおよび開示された - 10ヘテロ二量体を産生するためのベクター、宿主細胞、選択的結合因子（例えば、抗体）および方法に関する。また、 - 10および - 10ヘテロ二量体、ならびに選択的に - 10および - 10ヘテロ二量体に結合する因子を使用する方法を提供する。この方法は、 - 10またはその - 10ヘテロ二量体に関連した障害の診断および処置のための方法を含む。

【0003】

(発明の背景)

一般的に当該分野で認知されているものとして、現在、ヒトにおいて産生される5つの糖タンパク質ホルモンポリペプチドが公知である： - サブユニット、TSH - (甲状腺刺激ホルモン) - サブユニット、FSH - (卵胞刺激ホルモン) - サブユニット、LH - (黄体化ホルモン) - サブユニット、およびCG - (絨毛性ゴナドトロピン) - サブユニット；ThotakuraおよびBlithe, Glycobiology, 第5巻, 第3 - 10頁(1995)；Wondisfordら, 第1巻, Endocrinology (L. DeGroot編), 第208 - 217頁, W. B. Saunders Com

pany, Philadelphia, PA (1995); MoyleおよびCampbell, 第1巻, Endocrinology (L. DeGroot編), 第230-241頁, W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA (1995)。第19染色体上の単一のLH-サブユニット遺伝子に連結した、6つの相同な配列からなる多重遺伝子クラスターによってコードされるCG-サブユニットの例外を除き、これらのポリペプチドは、単一の遺伝子によって産生される; BoおよびBoime, Journal of Biological Chemistry, 第267巻, 3179-3184頁(1992)。

【0004】

単量体-サブユニット(FAS、または遊離-サブユニット)は、ホルモン活性を有し、そして下垂体および胎盤によって分泌される。FASは、下垂体および胎盤におけるプロラクチン産生細胞の分化において役割を果たすことが見出されている; Begeotら, Science, 第226巻, 566-568頁(1984), Van-BaelおよびDenef, Journal of Neuroendocrinology, 第8巻, 99-102頁(1996), およびMoyら, Endocrinology, 第137巻, 1332-1339頁(1996)を参照のこと。そしてFASはまた、胎盤でのプロラクチン分泌を刺激することが見出された; Blitheら, Endocrinology, 第129巻, 2257-2259頁(1991)を参照のこと。

【0005】

-サブユニットはまた、4つの-サブユニットの各々とヘテロ二量体化して、4つのヘテロ二量体性ホルモン(TSH、FSH、LHおよびCG)を形成する。TSH、FSHおよびLHは、下垂体において産生され、分泌顆粒において貯蔵され、そして適切な放出ホルモンが視床下部によって産生される場合に分泌される。CGは、胎盤において産生され、そして構成的に分泌される(これは、分泌顆粒中に貯蔵されない)ようである; Wondisfordら, 第1巻, Endocrinology (L. DeGroot編), 208-217頁, 前出, ならびに、HallおよびCrowley, Jr. 第1巻, Endocri

nology (L. DeGroot 編), 242 - 258 頁, W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA (1995) を参照のこと。

【0006】

TSHは、甲状腺ホルモンの産生を調節することによって、基礎代謝に影響を及ぼし、そして甲状腺癌の検出および処置を増強するために、臨床的に使用されている; McEvoy, G. (編), AHFS Drug Information, 2041 - 2042 頁, American Society of Health-System Pharmacists, Inc., Bethesda, MD (1998) を参照のこと。さらに、血中のTSHレベルを測定するための診断試験は、甲状腺障害が疑われる場合に、甲状腺の機能的状態を決定するために一般的に使用されている。

【0007】

FSHおよびLHは、雄性および雌性における生殖機能の維持(すなわち、性腺の成熟および性腺でのステロイド産生)において重要な役割を果たす。CGは、最初のトリメスターの間、ステロイドホルモンを産生するために黄体を刺激することによって、妊娠の維持に関与する。FSH、LHおよびCGは、不妊症を処置するため、そしてまた、体外受精(IVF)のような介助生殖手順(assisted reproduction procedure)における試薬として、臨床的に使用されている; McEvoy, G. (編), AHFS Drug Information, 2564 - 2567 頁, American Society of Health-System Pharmacists, Inc., Bethesda, MD (1998) を参照のこと。FSH、LHおよびCGのレベルを測定するための診断試験は、受胎能障害の診断のため、および妊娠について試験するために使用されている。

【0008】

上述の糖タンパク質ホルモンポリペプチドの天然に存在する代謝産物(例えば、CGのサブユニットに由来する α -コアフラグメント)が記載されているが、未だ、如何なる機能もこれらの代謝産物に割り当てられていない; Moyl e

およびCampbell, 第1巻, Endocrinology (L. DeGroot編), 230-241頁, 前出。

【0009】

1994年に、この5つの公知の糖タンパク質ホルモンポリペプチドは、ヒトCGの結晶構造に基づいて、シスチン-ノット(knot)増殖因子構造のスーパーファミリーに配置された; Laphornら, Nature, 第369巻, 455-61頁(1994)。このスーパーファミリーは、TGF-(トランスフォーミング増殖因子)、NGF(神経発育因子)およびPDGF(血小板由来増殖因子)の遺伝子ファミリーを含む。シスチン-ノットは、3つの分子内ジスルフィド結合によって形成され、非常に特徴的な構造を有し、そしてこのスーパーファミリーのすべてのメンバーの全体的な三次元構造を担う; Isaacs, Current Opinion in Structural Biology, 第5巻, 391-395頁(1995)。近年公開された特許出願は、シスチン-ノットファミリーの新規なメンバー(zsig51)を記載している; SheppardおよびLok, (1999)WIPO特許出願WO99/41377。zsig51は、実際に、糖タンパク質ホルモンファミリーの新規な様メンバーであることが決定されている。従って、本明細書中では、これを「2」または「アルファ()-2」という[Pasztyら, (2000)WIPO特許出願WO00/78964]。

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、一部分において、単離された分泌可能なヒトポリペプチド(配列番号1)を提供する。このヒトポリペプチドは、糖タンパク質ホルモンファミリーの新規な様メンバーであり、そして本明細書中では、「ベータ()-10」または「10」と称される。

【0011】

本発明に従う、ヒト10の全長アミノ酸配列を、図1に示す。10ポリペプチドについて予測されるN末端シグナルペプチドは、下線で示される。配列番号1の87位にあるアスパラギン(N)は、古典的なN×Tグリコシル化モチーフ

フ(ここでxは、プロリン以外の任意のアミノ酸を示し、そしてTは、スレオニンを示す)内に位置し、そしてグリコシル化される可能性がある。10アミノ酸配列におけるシグナルペプチド切断部位は、図1において四角で示される8つのアミノ酸の領域内であることが予期される。真のインビボ切断部位である可能性が最も高い部位でのシグナルペプチド切断を、「成熟」10ポリペプチドの配列において反映させる(配列番号3)。

【0012】

10ポリペプチドの最も可能性が高い「成熟」形態(すなわち、シグナルペプチドを除去するように、インサイチュでプロセスされた)を、BLASTとして公知のコンピューター分析プログラムを使用して、NonRedundant Proteinデータベースに対して実行して、既知のタンパク質に対する相同性(詳細には、共通して存在するアミノ酸残基または「保存された」アミノ酸残基)を試験した。上位112個の「ヒット」は、種々の哺乳動物種、鳥類種、および魚類種由来の種々の糖タンパク質ホルモン-サブユニットであることが見出された。これらの相同性は、10が、糖タンパク質ホルモンファミリーの新規な様メンバーであることを明確に示した。

【0013】

さらにGAP分析によって、4つの公知のヒト糖タンパク質ホルモン-サブユニット(上述)に対する10の相同性は、31~37%同一性および42~48%類似性であることが示された(本明細書中以降において言及される、図2A~Dを参照のこと)。4つの公知のヒト糖タンパク質ホルモンポリペプチドの成熟形態は、12個のシステイン残基を含み、これらのシステイン残基は、6つの分子内ジスルフィド結合を形成する。本発明のヒト10ポリペプチドの成熟形態は、10個のシステイン残基を含み、これらのシステイン残基は、5個の分子内ジスルフィド結合を形成する可能性がある。CG-のジスルフィド結合システイン対形成をモデルとして使用すると、本発明の10ポリペプチドにおける5つの推定ジスルフィド結合について、最も可能性が高いジスルフィド結合システイン対形成は、以下の通りである:配列番号3のC12-C60、C26-C75、C36-C91、C40-C93およびC96-C103(図3もま

た参照のこと)。

【0014】

マウス 10ポリペプチドの全長アミノ酸配列を、配列番号11に示す。そしてマウス 10 cDNAの完全コード領域のヌクレオチド配列を、配列番号12に示す。真のインビボ切断部位である可能性が最も高い部位でのシグナルペプチド切断を、「成熟」形態のマウス 10ポリペプチドの配列において反映させる(配列番号13)。BestFit分析によって、成熟形態マウス 10ポリペプチドと比較した場合の成熟形態ヒト 10ポリペプチドのアミノ酸相同性は、93.4%同一性および97.2%類似性であることが示された(本明細書中以降において言及される、図4を参照のこと)。

【0015】

本発明の 10ポリペプチドが、糖タンパク質ホルモンファミリーに論理的に内包されることに基づくと、このポリペプチドは、単量体(FASおよび -コアフラグメントに対して類似する)であり得、および/または1以上の糖タンパク質ホルモンファミリーポリペプチドとヘテロ二量体を形成し得る(例えば、二量体 / 10、 10/TSH-、 10/LH-)。 10ポリペプチドはまた、既知の糖タンパク質ホルモンポリペプチドとは異なるポリペプチドとヘテロ二量体を形成し得る。これらの種々の可能性に基づき、 10ポリペプチドは、1つより多くのホルモン(すなわち、 10ホルモン)を形成し得る。

【0016】

ヘテロ二量体化アッセイを使用して、ヒト 10が、上述のWO99/41377およびWO00/78964特許出願に記載のヒト 2ポリペプチドとヘテロ二量体を形成することを決定した。従って、新規なヘテロ二量体性糖タンパク質ホルモンである 2 / 10が発見され、そして規定された。

【0017】

糖タンパク質ホルモンのような分泌タンパク質についてのヘテロ二量体化アッセイの原則は、哺乳動物細胞中への2つの異なる遺伝子の同時トランスフェクション、馴化培地の収集、その遺伝子産物の1つに特異的に結合する抗体での免疫沈降、および他方の遺伝子産物に特異的に結合する抗体での免疫沈降物のウェス

タンブロットイングである。適所での適切なコントロール実験を使用して、ウェスタンにおいて正確なサイズのバンドが存在することは、アッセイの実験条件下での2つの遺伝子産物のヘテロ二量体化を示し、一方、ウェスタンにおいて正確なサイズのバンドが存在しないことは、そのアッセイの実験条件下において2つの遺伝子産物がヘテロ二量体化しなかったことを示す。公知のヘテロ二量体性糖タンパク質(LH、FSH、TSH、およびCG)は、適切な遺伝子での哺乳動物細胞の同時トランスフェクションによって容易に産生され得るので、同時トランスフェクションヘテロ二量体化アッセイに基づいたこの型の哺乳動物細胞は、糖タンパク質ホルモンファミリーのメンバーに適切である。

【0018】

ヒト 2 - ポリHis - タグ哺乳動物発現ベクターおよびヒト 10 - FLAG - タグ哺乳動物発現ベクターを、293細胞中に同時トランスフェクトし、そして無血清馴化培地を72時間後に収集した。免疫沈降を、抗-FLAG M2 - Agaroseアフィニティービーズ(Cat# A1205, Sigma, St. Louis, MO)を使用して実施した。この免疫沈降物のウェスタンブロットを、西洋ワサビペルオキシダーゼ(Linx HRP Rapid Protein Conjugation Kit, cat# 8050-01, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)に結合体化された、アフィニティー精製抗 2ウサギポリクローナル抗体(実施例4)でプローブした。強い 2 - ポリHis - タグバンドが、ECL Western Blot detection kit (cat# RPN 2106, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を使用して観察された。コントロール実験により、ウェスタンブロットにおける強い 2 - ポリHis - タグバンドの存在は、ヒト 10 - FLAG - タグ哺乳動物発現ベクターとの同時トランスフェクションおよび抗FLAG M2 - Agaroseアフィニティービーズの使用に、完全に依存することが示された。これらの2つの要素のいずれかが実験から外された場合またはそのままのアガロースビーズ(すなわち、抗FLAG抗体を有さない)が、免疫沈降工程に使用された場合には、2 - ポリHis - タグバンドは観察されなかった。

【0019】

公知のヘテロ二量体性糖タンパク質ホルモン (TSH、FSH、LHおよびCG)と同様に、2/10は、様糖タンパク質ホルモンポリペプチドと様糖タンパク質ホルモンポリペプチドとのヘテロ二量体である。

【0020】

これらのデータはまた、組換えの分泌2/10ヘテロ二量体(ポリHisアフィニティータグも、FLAGアフィニティータグも有さない)が、種々の治療的用途および診断的用途(以下にさらに記載される)のために哺乳動物細胞において産生され得ることを示す。

【0021】

CGのようなヘテロ二量体性糖タンパク質ホルモンはまた、例えば、適切な条件下における単離された α -サブユニットと単離されたCG- β サブユニットとの同時インキュベーションに際して、インビトロでアセンブルされ得る[BlytheおよびIles、Endocrinology、第136巻、903-910頁(1995)を参照のこと]。2/10ヘテロ二量体も同様に、単離された2ポリペプチドと単離された10ペプチドとの同時インキュベーションに際して、インビトロでアセンブルされ得る。このようなアセンブルされた2/10ヘテロ二量体は、種々の治療的用途および診断的用途(以下にさらに記載される)のために使用され得る。

【0022】

マウス2単独、マウス10単独またはマウス2/10ヘテロ二量体を過剰発現する、トランスジェニックマウスを作製した(実施例6を参照のこと)。2/10ヘテロ二量体を過剰発現するそれらのトランスジェニックのみが、コントロールマウスと比較した場合に、明確な表現型的差異を示した。この2/10を過剰発現するトランスジェニックマウスは、血清T4レベルの上昇によって示されるように、多発性の濾胞性乳頭状腺腫による両方の甲状腺肥大および生じた甲状腺機能亢進症によって特徴付けられる表現型を示した。他の表現型変化は、全身性の甲状腺機能亢進状態に関連すると思われ、そしてこれらには、中程度の肝腫、肝細胞過形成、および血清コレステロールレベルのわずかな上

昇、両側の腎肥大、および穏やか～中程度の白血球増加症（リンパ球の優性を伴う）が含まれた（実施例6を参照のこと）。従って、正常なマウス設定において、 $2/10$ は、明らかに、甲状腺刺激ホルモン（TSH）様活性を有する。マウス 2 とヒト 2 との間の高いレベルのアミノ酸保存〔推定成熟形態（すなわち、シグナルペプチドを有さない）について、 88.5% の同一性および 90.4% の類似性〕、マウス 10 とヒト 10 との間の高いレベルのアミノ酸保存〔推定成熟形態（すなわち、シグナルペプチドを有さない）について、 93.4% の同一性および 97.2% の類似性〕、およびマウス甲状腺の生物学とヒト甲状腺の生物学との間の非常に高い類似性に起因して、ヒト $2/10$ ヘテロ二量体は、マウス $2/10$ ヘテロ二量体に見出された活性と同じ甲状腺刺激ホルモン（TSH）様活性を有することが予測される。TSH様活性に加えて、 $2/10$ は、本明細書中以下により詳細に記載するように、異なる生理学の設定（すなわち、疾患状態）における、他の明確な生物学的効果を有し得る。

【0023】

TSHは、甲状腺ホルモンの産生を調節することによって基礎代謝に影響し、そして甲状腺癌の検出および処置を増強するために臨床的に使用される；McEvoy, G. (編)、AHFS Drug Information, 2041-2042頁、American Society of Health-System Pharmacists, Inc., Bethesda, MD (1998)を参照のこと。さらに、血液中のTSHレベルを測定するための診断試験が、甲状腺障害が予測される場合の甲状腺の機能的状態を決定するために、一般的に使用される。ヒト $2/10$ は、TSHと同様の臨床的有用性を有し、そして甲状腺に関連する疾患および障害の処置および診断に有用であるようである。さらに、ヒト $2/10$ は、他の治療的用途および診断用途を有し得、これらを、本明細書中に記載する。ヒト $2/10$ 選択的結合因子（例えば、抗体）が、TSH選択的結合因子と類似の臨床的有用性を有し、そして従って、甲状腺に関連する疾患および障害の処置および診断に有用であると推測することは妥当である。さらに、ヒト $2/10$ 選択的結合因子は、本明細書中に記載されるような、他の治療的用途および診断的用途を有し得る。

【0024】

本発明はまた、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する：

- (a) 配列番号2に示されるヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号1に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
- (c) 中程度にストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下で(a)または(b)の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、そのコードされるポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；および
- (d) (a)～(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0025】

本発明はまた、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する：

- (a) 配列番号1に示されるポリペプチドに対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号2に示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、ここで、そのコードされるポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号2、(a)または(b)のヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；
- (d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号2または(a)～(c)のヌクレオチド配列；

(e) 中程度にストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下で(a)~(d)のうちのいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、そのコードされるポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(f) (a)~(d)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0026】

本発明はさらに、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号1に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号1に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号1に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号1に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号1に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/1

0ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)~(e)のヌクレオチド配列；

(g) 中程度にストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下で(a)~(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、そのコードされるポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(h) (a)~(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0027】

本発明はまた、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する：

(a) 配列番号3に示される成熟アミノ酸配列であって、必要に応じて、アミノ末端メチオニンを含み、アミノ酸配列；

(b) 配列番号3のオルソログのアミノ酸配列であって、ここで、そのコードされるポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 配列番号3に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%パーセント同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む、配列番号3に示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、フラグメント；

(e) 配列番号3に示されるアミノ酸配列または(a)~(c)の少なくとも1つのいずれかの、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト2ポリペプチドにヘテロ二量体化

された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列。

【0028】

本発明はさらに、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する：

(a) 少なくとも1つの保守的アミノ酸置換を有する、配列番号3に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号3に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号3に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する、配列番号3に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列；および

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号3に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、ヒト 2ポリペプチドにヘテロ二量体化された場合、ヒト 2 / 10ヘテロ二量体の活性を有する、アミノ酸配列。

【0029】

上記の(a)～(e)のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。

【0030】

本発明はまた、本明細書中に示される単離された核酸分子を含む、発現ベクター、本明細書中に示される組換え核酸分子を含む、組換え宿主細胞、および本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を産生するための方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、このようにして産生された 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を単離する工程、を包含する。

【0031】

本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体をコードする核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト動物もまた、本発明に包含される。これらの核酸分子は、 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の発現およびそのレベルの増加（循環中のレベルの増加を含み得る）を可能にする様式で、その動物に導入される。このトランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは、哺乳動物である。

【0032】

本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の誘導体もまた、提供される。

【0033】

さらに、本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を特異的に結合し得る、抗体およびペプチドのような選択的結合因子が提供される。このような抗体およびペプチドは、 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の活性に対するアゴニストまたはアンタゴニストであり得る。

【0034】

本発明のヌクレオチド、 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体、または選択的結合因子と、1以上の薬学的に受容可能な処方剤とを含む、薬学的組成物もまた、本発明に包含される。これらの薬学的組成物は、本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドの治療有効量を提供するように使用される。本発明はまた、これらの核酸分子、 10ポリペプチド、 2 / 10ヘテロ二量体および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0035】

本発明の核酸分子、 10ポリペプチド、 2 / 10ヘテロ二量体および選択的結合因子は、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む疾患および障害を、処置、予防、改善および/または検出するために使用され得る。

【0036】

本発明はまた、 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体に結合する試験分子を同定するための、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体に試験分子を接触させる工程、および 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体への試験分子の結合の程度を試験する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体のアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程を包含する。本発明はさらに、 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の発現あるいは 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の活性に対する、分子の影響を試験する方法を提供する。

【0037】

本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の発現を調節する方法およびレベルをモジュレート（すなわち、増加または減少）する方法もまた、本発明に包含される。1つの方法は、このような 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体をコードする核酸分子を、動物に投与する工程を包含する。別の方法において、本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の発現を調節またはモジュレートするエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載するような、遺伝子治療、細胞療法、およびアンチセンス療法が挙げられる。

【0038】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして記載される主題を限定することとして解釈されるべきではない。本願において引用される全ての参考文献は、明示的に本明細書中に参考として援用される。

【0039】

(定義)

用語「 10 遺伝子」または「 10 核酸分子」また「ポリヌクレオチド」とは、配列番号2に示されるヌクレオチド配列、配列番号1に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1210におけるDNAインサートのヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むかまたはこれらからなる、核酸分子をいう。

【0040】

用語「 10 ポリペプチド」とは、配列番号3のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連するポリペプチドをいう。関連するポリペプチドとしては、以下が挙げられる： 10 ポリペプチド対立遺伝子改変体、 10 ポリペプチドオルソログ、 10 ポリペプチドスプライス改変体、 10 ポリペプチド改変体、および 10 ポリペプチド誘導体。 10 ポリペプチドは、本明細書中に定義されるような、成熟ポリペプチドであり得、そして調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

【0041】

用語「 10 ポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物または生物の集団の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替形態のうちの1つをいう。

【0042】

用語「 10 ポリペプチド誘導体」とは、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、配列番号3に示されるポリペプチド、そのポリペプチド対立遺伝子改変体、そのポリペプチドオルソログ、そのポリペプチドスプライス改変体、またはそのポリペプチド改変体をいう。

【0043】

用語「 10 ポリペプチドフラグメント」とは、以下のポリペプチドのアミノ酸末端での短縮（リーダー配列を含むか、または含まない）および/またはカルボキシ末端での短縮を含むポリペプチドをいう：配列番号3に示されるポリペプチド、そのポリペプチド対立遺伝子改変体、そのポリペプチドオルソログ、そのポリペプチドスプライス改変体、および/または配列番号3に示される 10 ポ

リペプチドアミノ酸配列と比較した場合に1つ以上のアミノ酸の付加もしくは置換もしくは内部欠失を有するそのポリペプチド改変体(生じるポリペプチドが、少なくとも6アミノ酸以上の長さである)。ポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシングからか、またはインビボプロテアーゼ活性から、生じ得る。好ましい実施形態において、短縮は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。そのように生成されたポリペプチドフラグメントは、約25個連続するアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含む。このようなポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を生成するために、使用され得ることが、理解される。

【0044】

用語「10融合ポリペプチド」とは、以下のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端での1つ以上のアミノ酸(例えば、異種ペプチドまたは異種ポリペプチド)の融合物をいう:配列番号3に示されるポリペプチド、ポリペプチド対立遺伝子改変体、ポリペプチドオルソログ、ポリペプチドスプライス改変体、または配列番号3に示される10ポリペプチドアミノ酸配列と比較した場合に、1つ以上のアミノ酸の欠失、置換、または内部付加を有する、ポリペプチド改変体。

【0045】

用語「10ポリペプチドオルソログ」とは、配列番号3に示される10ポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウス10ポリペプチドとヒト10ポリペプチドとは、互いにオルソログであると見なされる。

【0046】

用語「10ポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号3に示される10ポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロ

セシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をいう。

【0047】

用語「10ポリペプチド改変体」とは、配列番号3に示される10ポリペプチドアミノ酸配列と比較した場合、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および/もしくはポリペプチドフラグメント）、ならびに/または付加（例えば、内部付加および/もしくは融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含む、10様ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在し得る（例えば、10様ポリペプチド対立遺伝子改変体、10様ポリペプチドオルソログ、および10様スプライス改変体）か、または人工的に構築され得る。このようなポリペプチド改変体は、配列番号2に示されるDNA配列からしかるべく変動するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1～3個、または1～5個、または1～10個、または1～15個、または1～20個、または1～25個、または1～50個、または1～75個、または1～100個、または100個よりも多いアミノ酸の置換、挿入、付加および/もしくは欠失を有し、ここでその置換は、保存的であっても、または非保存的であってもよいし、あるいはその組み合わせであってもよい。

【0048】

用語「2/10ヘテロ二量体」とは、10ポリペプチドと2ポリペプチドとのヘテロ二量体をいう。

【0049】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生するために動物において用いられ得る、分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

【0050】

用語「生物学的に活性な10ポリペプチド」とは、ヒト2ポリペプチドとヘテロ二量体形成した場合に、ヒト2/10ヘテロ二量体の活性を有する、10様ポリペプチドをいう。

【0051】

用語「有効量」および「治療的に有効な量」とは、各々、本明細書中に記載される 2 / 10ヘテロ二量体の観察可能なレベルの1つ以上の生物学的活性を支持するために使用される、本発明の 10核酸分子または 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の量をいう。

【0052】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞において使用するのに適切であり、そして異種核酸配列の発現を指向および/または制御する核酸配列を含む、ベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング(イントロンが存在する場合)のようなプロセスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0053】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたかまたは形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る、細胞をいうために用いられる。この用語は、この選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝的構成においてもとの親と同一であってもなくても、この親細胞の子孫を含む。

【0054】

用語「同一性(identity)」は、当該分野で公知のように、2つ以上のポリペプチド分子、または2つ以上の核酸分子の配列の間にある、これらの配列を比較することによって決定される、関係をいう。当該分野では、「同一性」はまた、核酸分子またはポリペプチドの間の配列関連性の程度(場合によっては、2つ以上のヌクレオチド配列または2つ以上のアミノ酸配列のストリングの間の一致により決定され得る)を意味する。「同一性」は、特定の算術モデルまたはコンピュータープログラム(すなわち、アルゴリズム)によって位置付けられる、ギャップアライメント(存在する場合)を有する2つ以上の配列のうちの短い方の間の同一適合のパーセントを測定する。

【0055】

用語「類似性(similarity)」は、関連する概念であるが、「同一性」とは対照的に、「類似性」とは、同一適合および保存的置換適合の両方を含む関連性の尺度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば、10/20の同一

のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換であるならば、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、両方とも50%である。同じ例で、保存的置換が存在するさらに5つの位置が存在するならば、同一性パーセントは、50%のままであるが、類似性パーセントは75% (15/20) である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチドの間の類似性パーセントは、これらの2つのポリペプチドの間の同一性パーセントよりも高い。

【0056】

用語「単離された核酸分子」とは、天然で結合している少なくとも1つの夾雑核酸分子を含まない、本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる、その天然の環境において見出される他のいかなる夾雑核酸分子も他の夾雑物も、実質的には含まない。

【0057】

用語「単離されたポリペプチド」とは、その天然の環境において見出される少なくとも1つの夾雑ポリペプチドも他の夾雑物も含まない、本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、その治療用途、診断用途、予防用途または研究用途を妨害する、その天然の環境において見出されるいかなる他の夾雑ポリペプチドも他の夾雑物も実質的に含まない。

【0058】

用語「成熟 10ポリペプチド」とは、リーダー配列を欠く 10ポリペプチドをいう。成熟 10ポリペプチドはまた、アミノ末端（リーダー配列を有するか、または有さない）および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセシング、より大きい前駆体からのより小さいポリペプチドの切断、N結合型グリコシル化および/またはO結合型グリコシル化などのような、他の改変を含み得る。

【0059】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNA配列またはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのうちのいずれかから形成される分子を含み、この塩基アナログは、例えば、以下であるがこれらに限

定されない：4 - アセチルシトシン、8 - ヒドロキシ - N6 - メチルアデノシン、アジリジニル - シトシン、プソイドイソシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル) ウラシル、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6 - イソ - ペンテニルアデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチルプソイドウラシル、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノ - メチル - 2 - チオウラシル、 β - D - マンノシルキューオシン (β - D - mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボニル - メチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン (queosine)、2 - チオシトシン、および 2, 6 - ジアミノプリン。

【0060】

用語「天然に存在する」または「ネイティブ」は、生物学的材料（例えば、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞など）に関して使用される場合、天然に見出されかつ人工的に操作されていない材料をいう。同様に、「天然に存在しない」または「非ネイティブ」は、本明細書中において使用される場合、天然には見出されないか、または人工的に構造改変されたかもしくは合成された、材料をいう。

【0061】

用語「作動可能に連結された」は、隣接配列の配置方法をいうために本明細書中に使用される。ここで、このように記載される隣接配列は、その有用な機能を実行するように構成されるかまたは組立てられる。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、コード配列の複製、転写および/または翻訳をもた

らし得る。例えば、プロモーターがコード配列の転写を指向し得る場合、このコード配列は、このプロモーターに作動可能に連結される。隣接配列は、正確に機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写される介在配列は、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そして、このプロモーター配列はなお、このコード配列に「作動可能に連結された」とみなされ得る。

【0062】

本明細書中に使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、薬学的組成物として 10 核酸分子、 10 ポリペプチド、 2 / 10 ヘテロ二量体または本発明の選択的結合因子の送達を、達成するかまたは増強するために適切な 1 つ以上の処方材料をいう。

【0063】

用語「選択的結合因子」は、本発明の 10 ポリペプチドおよび / または 2 / 10 ヘテロ二量体に対して特異性を有する分子をいう。本明細書中に使用される場合、用語「特異的」および「特異性」は、ヒト 10 ポリペプチドおよび / または 2 / 10 ヘテロ二量体に結合するがヒト非 10 ポリペプチドおよび / または非 2 / 10 ヘテロ二量体に結合しない、選択的結合因子の能力をいう。しかし、選択的結合因子が、配列番号 3 に示されるようなポリペプチドのオルソログおよび / またはヒト 2 / 10 ヘテロ二量体のオルソログ（すなわち、その種間のバージョン（例えば、マウスポリペプチドおよびラットポリペプチド））もまた結合し得ることが、理解される。

【0064】

用語「形質導入」は、1 つの細菌から別のものへの（通常、ファージによる）遺伝子の移入をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および移入をいう。

【0065】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来 DNA または外因性 DNA の取り込みをいうために使用される。そして、細胞は、外因性 DNA が細胞膜の内側に導入された場合、「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェ

クション技術は、当該分野で周知であり、そして、本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、*Virology*, 52:456, 1973; Sambrookら、*Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories (New York, 1989); Davisら、*Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, 1986; およびChuら、*Gene*, 13:197, 1981を参照のこと。このような技術は、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入するために使用され得る。

【0066】

用語「形質転換」は、本明細書中に使用される場合、細胞の遺伝特徴における変化をいい、そして細胞は、新たなDNAを含むように変更された場合、形質転換されている。例えば、細胞は、そのネイティブな状態から遺伝的に変更された場合、形質転換されている。トランスフェクションおよび形質導入に続いて、形質転換DNAは、細胞の染色体へ物理的に介入させることによって、細胞のDNAと組み換わり得、これは、複製されることなくエピソームエレメントとして一過性に維持され得るか、またはプラスミドとして独立して複製され得る。細胞は、DNAが細胞の分裂を伴って複製される場合、安定に形質転換されているとみなされる。

【0067】

用語「ベクター」は、コード情報を宿主細胞へ移入させるために使用される、任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

【0068】

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連する核酸分子が、配列番号2の核酸分子の対立遺伝子またはスプライス改変体を含み、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むことが、理解される。関連する核酸分子はまた、配列番号1のポリペプチドと比較して、1つ以上のアミノ酸残基の置換、変更、付加、および/または欠失を

含むか、またはこれらから本質的になるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0069】

フラグメントは、配列番号1のポリペプチドの、少なくとも約25アミノ酸残基、または約50、または約75、または約100、または約100より多いアミノ酸残基のポリペプチドをコードする核酸分子を含む。

【0070】

さらに、関連する10核酸分子としては、本明細書中に規定されるような程度にストリンジेंटな条件または高度にストリンジेंटな条件下で、配列番号2の核酸分子の完全な相補配列、または配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子の完全な相補配列、または本明細書中に規定されるような核酸フラグメントの完全な相補配列、または本明細書中に規定されるようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの完全な相補配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が挙げられる。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供される10配列を用いて調製されて、関連する配列に関して、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、または合成DNAライブラリーをスクリーニングし得る。既知の配列と有意な同一性を示す10ポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列の領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこのような領域は、スクリーニングのためのプローブを設計するために使用され得る。

【0071】

用語「高度にストリンジेंटな条件」は、配列が高度に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そして有意に不一致な(mismatch)DNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジエンスは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジेंटな条件」の例は、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、65~6

8、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および50% ホルムアミド、42 である。Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989); Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: a practical approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

【0072】

よりストリンジェントな条件(例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤)を、使用してもよいが、ハイブリダイゼーションの速度は、影響を受ける。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニル-ピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(NaDodSO_4 すなわちSDS)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子DNA(または他の非相補的DNA)、および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH6.8~7.4で実施されるが、代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpH独立である。Andersonら、Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。

【0073】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび

塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適合させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る：

$$T_m() = 81.5 + 16.6(\log [Na +]) + 0.41(\%G + C) - 600 / N - 0.72(\%ホルムアミド)$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、[Na+]は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の(グアニン+シトシン)塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致に対して約1ずつ減少する。

【0074】

用語「中程度にストリンジेंटな条件」は、「高度にストリンジेंटな条件」下で生じ得るよりもより大きい程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジेंटな条件」の例は、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、50~65、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37~50である。例として、0.015M ナトリウムイオン中、50の「中程度にストリンジेंटな」条件は、約21%の不一致を許容する。

【0075】

「高度」にストリンジेंटな条件と「中程度」にストリンジेंटな条件との間に完全な区別は存在しないことが、当業者によって理解される。例えば、0.015M ナトリウムイオン(ホルムアミドなし)において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71である。65(同じイオン強度)での洗浄において、これは、約6%の不一致を許容する。より離れた関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇し得る。

【0076】

約20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1M NaCl*における融解温度の適切な概算は、以下：

$T_m = 1\text{つのA-T塩基対につき}2 + 1\text{つのG-C塩基対につき}4$
によって提供される。

【0077】

*6×クエン酸ナトリウム塩(SSC)におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである。Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes、683頁、BrownおよびFox(編)(1981)を参照のこと。

【0078】

オリゴヌクレオチドに対して高度にストリンジェンシーな洗浄条件は、通常、6×SSC、0.1%SDSにおいて、このオリゴヌクレオチドの T_m より0~5 低い温度である。

【0079】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、配列番号2に示されるようなヌクレオチド配列に約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号1に示されるポリペプチドに約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこれから本質的になる。好ましい実施形態において、このヌクレオチド配列は、配列番号2に示されるヌクレオチド配列に、約70パーセント、75パーセント、80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95、96、97、98または99パーセント同一であるか、あるいは、このヌクレオチド配列は、配列番号1に示されるポリペプチド配列に、約70パーセント、75パーセント、80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95、96、97、98、または99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。

【0080】

核酸配列における差異は、配列番号1のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的変更および/または非保存的変更を生じ得る。

【0081】

配列番号1のアミノ酸配列に対して保存的な変更（およびコードするヌクレオチドに対する対応する変更）は、天然に存在する10ポリペプチドに類似した機能的特徴および化学的特徴を有する、本発明による10様ポリペプチドを生成する。対照的に、10ポリペプチドの機能的特徴および/または化学的特徴における実質的な変更は、配列番号1のアミノ酸配列において置換を選択することによって達成され得、これは、(a)置換領域における分子骨格の構造（例えば、シートコンフォメーションまたはらせんコンフォメーションのような）、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、あるいは(c)大部分の側鎖、の維持に対するその影響がかなり異なる。

【0082】

例えば、「保存的なアミノ酸置換」は、その位置におけるアミノ酸残基の極性または電荷にほとんど影響がないか、またはこれらの影響がないような、ネイティブなアミノ酸残基の非ネイティブな残基を用いた置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニン走査変異誘発」に関して以前に記載されたように、アラニンで置換され得る。

【0083】

保存的なアミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりむしろ、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。

【0084】

天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいてグループに分けられ得る

:

- 1) 疎水性: Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- 2) 中性の親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- 3) 酸性: Asp、Glu;
- 4) 塩基性: His、Lys、Arg;
- 5) 鎖の方向に影響を与える残基: Gly、Pro; および

6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

【0085】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーへの交換を含み得る。このような置換された残基は、非ヒト10ポリペプチドオルソログと相同性であるヒト10ポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同性領域に導入され得る。

【0086】

このような変更を作製する場合、アミノ酸の疎水性親水性指標 (hydrophobic index) が、考慮され得る。各アミノ酸には、その疎水性特徴および荷電特徴に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられている。これらは、イソロイシン (+4.5); バリン (+4.2); ロイシン (+3.8); フェニルアラニン (+2.8); システイン/シスチン (+2.5); メチオニン (+1.9); アラニン (+1.8); グリシン (-0.4); スレオニン (-0.7); セリン (-0.8); トリプトファン (-0.9); チロシン (-1.3); プロリン (-1.6); ヒスチジン (-3.2); グルタミン酸 (-3.5); グルタミン (-3.5); アスパラギン酸 (-3.5); アスパラギン (-3.5); リジン (-3.9) およびアルギニン (-4.5) である。

【0087】

タンパク質に対して相互作用的な生物学的機能を付与することにおけるハイドロパシーアミノ酸指標の重要性は、当該分野において理解されている (Kyteら、J. Mol. Biol. 157: 105-31 (1982))。特定のアミノ酸が類似のハイドロパシー指標またはハイドロパシースコアを有する他のアミノ酸に代わって置換され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ハイドロパシー指標に基づいて変化を起こす際に、ハイドロパシー指標が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。

【0088】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る (特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場

合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して考慮される場合) こともまた、当該分野において理解されている。その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される、タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その免疫原性および抗原性に、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に、相関する。

【0089】

以下の親水性の値が、以下のアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0 ± 1)；グルタミン酸 (+3.0 ± 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 ± 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；およびトリプトファン (-3.4)。類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープを、親水性に基づいて同定もし得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」とも呼ばれる。

【0090】

所望のアミノ酸置換 (保存的であれ非保存的であれ) は、当業者によって、そのような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、10ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載される10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の親和性を増加もしくは減少させ得る。

【0091】

例示的なアミノ酸置換は、表Iに記載される。

【0092】

(表1)

(アミノ酸置換)

【0093】

【表1】

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノロイシン	Leu
Leu	ノロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミド - アミノ酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノロイシン	Leu

当業者は、配列番号1または配列番号3のポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられ

ない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが公知である場合には、当業者は、10ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、10ポリペプチドの領域における変化が、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の生物学的活性および/または構造に不利に影響を与える可能性はさほどないことが、理解される。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を維持しながら、天然に存在する残基を化学的に類似するアミノ酸に置換し得ることを知っている（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に不利に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0094】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造-機能研究を再調査し得る。このような比較を考慮して、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応する10ポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、10ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似するアミノ酸での置換を、選択し得る。

【0095】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造、およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。このような情報を考慮して、当業者は、10ポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各アミノ酸残基に含む、試験改変体を生成し得る。次いで、これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニ

ングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、破壊された活性、望ましくなく減少した活性、または適切でない活性を生じたことを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0096】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Moult, J., Curr. Opin. Biotech. 7(4):422-427(1996); Chouら、Biochemistry 13(2):222-245(1974); Chouら、Biochemistry 113(2):211-222(1974); Chouら、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47:45-148(1978); Chouら、Annu. Rev. Biochem. 47:251-276(1978); および Chouら、Biophys. J., 26:367-384(1979)を参照のこと。さらに、コンピュータープログラムが、二次構造の予測を補助するために現在利用可能である。二次構造を推測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%よりも大きい配列同一性、または40%よりも大きい配列類似性を有する、2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長により、二次構造の推測可能性(ポリペプチド構造またはタンパク質構造内の潜在的な折り畳みの数を含む)の促進がもたらされた。Holmら、Nucl. Acid. Res. 27(1):244-47(1999)を参照のこと。所定のポリペプチドもしくはタンパク質において限定された数の折り畳みが存在すること、および一旦臨界数の構造が決定されると、構造予測が劇的により正確になること、が示唆されている(Brennerら、Curr. Op. Struct. Biol. 7(3):369-376(1997))。

【0097】

二次構造を推定するさらなる方法は、「スレッディング (threading)」(Jones, Curr. Opin. Struct. Biol. 7(3): 377-387 (1997); Sipplら、Structure 4(1): 15-9 (1996))、「プロフィール分析」(Bowieら、Science, 253: 164-170 (1991); Gribskovら、Meth Enzym. 183: 146-159 (1990); Gribskovら、Proc. Nat. Acad. Sci. 84(13): 4355-4358 (1987))、および「進化学的連鎖」(Homeら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと)を包含する。

【0098】

本発明に従う好ましい 10ポリペプチド改変体または 2 / 10ヘテロ二量体改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が配列番号1に記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、本発明に従う 10ポリペプチド改変体または 2 / 10ヘテロ二量体改変体は、配列番号1に記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN結合グリコシル化部位を含む。N結合グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型糖鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN結合型糖鎖を除去する。1つ以上のN結合グリコシル化部位(代表的には、天然に存在するグリコシル化部位)が排除され、そして1つ以上の新たなN結合部位が作製される、N結合型糖鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましい 10ポリペプチド改変体または 2 / 10ヘテロ二量体改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号1に記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体が、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な立体構造へとリフォールディングされなければならない場合に、有用であ

る。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0099】

さらに、配列番号3のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのポリペプチド改変体は、異種ポリペプチド（例えば、限定しないが、2）に融合されてヘテロ二量体を形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：10融合ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の検出および/または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分；触媒的に活性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；10が正常に二量体化するポリペプチド（例えば、2）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいはそのポリペプチド改変体とは異なる治療活性を有する、ポリペプチド。

【0100】

融合は、配列番号3に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいはポリペプチド改変体の、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いずに直接であっても、リンカーもしくはアダプター分子を使用して間接的であってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約20～約50アミノ酸残基であり得る。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合した部分の分離を可能にするために、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼについての切断部位を有して設計され得る。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【0101】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号3のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはポリペプチド改変体は、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合される。抗体は、以下の2つの機能的に独立した部分を含む；抗原を結合する「Fab」として公知の可変ドメイン、ならびに補体活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に關与する、「Fc」として公知の定常ドメイン。Fcは、長い血清半減期を有し、一方でFabは、短寿命である。Caponら、Nature 337:525-31(1989)。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテインA結合、補体結合のような機能、および恐らく、胎盤移入のような機能さえも、組み込み得る(同書)。表IIは、当該分野において公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

【0102】

【表2】

表2
治療的タンパク質を含むFc融合物

Fcの形態	融合パートナー	治療関係	文献
IgG1	CD30-LのN 末端	ホジキン病； 未分化リンパ腫； T細胞白血病	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fcγ2a	IL-10	抗炎症 移植拒絶反応	Zheng et al. (1995), J. Immunol., <u>154</u> : 5590-5600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher et al. (1996), N. Engl. J. Med., <u>334</u> : 1697-1702; Van Zee et al., (1996), J. Immunol., <u>156</u> : 2221-2230
IgG, IgA, IgM, 及び IgE (第1ドメインは 除く)	TNF レセプター	炎症, 自己免疫疾患	U.S. Pat. No. 5,808,029, issued September 15, 1998

(表 2 のつぎ)②

IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon et al. (1989), Nature 337: 525-531
IgG1, IgG3	IL2のN末端	抗がん 抗ウイルス	Harvill et al. (1995), Immunotech., 1: 95-105
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症; 骨密度	WO 97/23614, published July 3, 1997
IgG1	レプチン(leptin) のN末端	抗肥満症	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
ヒト Ig Cγ1	CTLA-4	自己免疫疾患	Linsley (1991), J. Exp. Med., 174:561-569

一つの例において、ヒトIgGヒンジ領域、CH2およびCH3領域の全てまたは一部は、当業者に公知の方法を使用して10ポリペプチドのN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。得られる10融合ポリペプチドまたは2/10融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって精製され得る。Fc領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、融合されていない対応物よりも実質的に長い半減期を示すことが見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化/多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または特定の質(例えば、治療的質、循環時間、凝集の減少など)を改善するために変更され得る。

【0103】

関連する核酸分子およびペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: Computational Molecular Biolo

gy, Lesk, A.M. 編, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., および Griffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 編, M. Stockton Press, New York, 1991; ならびに Carillo 編, SIAM J. Applied Math., 48: 1073, (1988) に記載される方法。

【0104】

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間に最も大きな一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムに記載される。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: GCGプログラムパッケージ(GAP(Devereuxら、Nucl. Acid. Res., 12: 387, 1984; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)を含む)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschulら、J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990)。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information(NCBI)および他の供給源(BLAST Manual, Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschulら、上記)から公に入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた同一性を決定するため

に使用され得る。

【0105】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定の整列スキームは、2つの配列の短い領域のみの一致を生じ得、この小さな整列された領域は、2つの全長配列間に有意な関係がないとしても非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態においては、選択された整列方法(GAPプログラム)は、標的ポリペプチドの少なくとも50個の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0106】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)を使用して、配列同一性の割合が決定される2つのポリペプチドは、それらのそれぞれのアミノ酸の最適の一致(アルゴリズムによって決定される「一致したスパン(matched span)」)について整列される。ギャップオープニングペナルティー(gap opening penalty)(これは、平均ダイアゴナルの3倍として計算され;「平均ダイアゴナル」は、使用される比較マトリクスのダイアゴナルの平均であり;「ダイアゴナル」は、特定の比較マトリクスによってそれぞれの完全なアミノ酸一致に割り当てられるスコアまたは数である)およびギャップエクステンションペナルティー(これは、通常ギャップオープニングペナルティーの1/10である)、ならびにPAM250またはBLOSUM62のような比較マトリクスがアルゴリズムとともに使用される。標準比較マトリクス(PAM250比較マトリクスについてDayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、第5巻、補遺3(1978);BLOSUM62比較マトリクスについてHenikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:10915-10919、1992)もまたアルゴリズムによって使用される。

【0107】

ポリペプチド配列の比較に好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる

:

アルゴリズム (Algorithm) : Needlemanら, J. Mol. Biol. 48 : 443 - 453 (1970)、

比較マトリクス (Comparison matrix) : BLOSUM 62 (HenikoffおよびHenikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 - 10919 (1992)より)

ギャップペナルティー (Gap Penalty) : 12

ギャップレングスペナルティー (Gap Length Penalty) : 4

類似性の閾値 : 0。

【0108】

GAPプログラムは、上記パラメーターを用いて有用である。上記パラメーターは、GAPアルゴリズムを使用してポリペプチド比較についてのデフォルトパラメーター (末端ギャップについてペナルティーなしで) である。

【0109】

核酸分子配列比較についての好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる :

アルゴリズム : Needlemanら, J. Mol Biol. 48 : 443 - 453, 1970

比較マトリクス : 一致 = +10、不一致 = 0

ギャップペナルティー : 50

ギャップレングスペナルティー : 3。

【0110】

GAPプログラムはまた、上記パラメーターを用いて有用である。上記パラメーターは、核酸分子比較についてのデフォルトパラメーターである。

【0111】

他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較マトリクス、類似性の閾値などが使用され得、これには、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを

含む。なされる特定の選択は、当業者に明らかであり、なされる特定の比較（例えば、DNA - DNA間、タンパク質 - タンパク質間、タンパク質 - DNA間）；さらに、比較が配列の対間である（この場合、GAPまたはBestFitが一般的に好ましい）か、一つの配列と配列の大きなデータベースとの間（この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい）であるか）に依存する。

【0112】

（合成）

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子が組換え手段および他の手段によって作製され得ることが当業者に理解される。

【0113】

（核酸分子）

核酸分子は、本発明の10ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、種々の方法（化学合成、cDNAまたはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニングおよび/またはcDNAのPCR増幅を含むがこれらに限定されない）で容易に得られ得る。

【0114】

本明細書中で使用される組換えDNA方法は、一般的に、Sambrookら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)）および/またはAusubelら編（Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, NY (1994)）に記載される方法である。本発明は、本明細書中に記載されるような核酸分子、およびその分子を得るための方法を提供する。

【0115】

10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が一つの種から同定された場合、その遺伝子の全てまたは一部は、同じ種からのオーソログ遺伝子または関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用され得る。プローブまたはプ

ライマーは、10ポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源からのcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。さらに、配列番号2に記載される配列を有する核酸分子の一部または全てを使用してゲノムライブラリーをスクリーニングし、10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的には、中程度または高いストリンジエンシーの条件は、スクリーニングのために使用されてスクリーニングから得られた偽陽性の数を最小にする。

【0116】

10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現クローニング（これは、発現されたタンパク質の性質に基づく陽性クローンの検出を使用する）によって同定され得る。代表的には、核酸ライブラリーは、宿主細胞表面において発現されそして示されるクローン化タンパク質への抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）の結合によってスクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、検出可能な標識を用いて修飾されて所望のクローンを発現するそれらの細胞を同定する。

【0117】

以下に記載される説明に従って行われる組換え発現技術は、これらのポリヌクレオチドを作製し、そしてコードされるポリペプチドを発現するために従われ得る。例えば、10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、大量の所望のヌクレオチド配列を容易に作製し得る。次いで、この配列を使用して検出プローブまたは増幅プライマーを作製し得る。あるいは、10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされる10ポリペプチドは、大量に作製され得る。

【0118】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、cDNAは、酵素逆転写酵素を使用してポリ(A)+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー（代表的には

、 10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNA（オリゴヌクレオチド）の2つの別の領域に相補的である）を、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにcDNAに加え、そしてポリメラーゼは、2つのプライマー間のcDNA領域を増幅する。

【0119】

10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の方法は、Engelsら, *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28:716-734, 1989に記載されるような当業者に周知の方法を使用する化学合成による。これらに方法には、特に、核酸合成のためのホスホトリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成のための好ましい方法は、標準的なホスホラミダイト化学を使用するポリマー支持合成である。代表的には、10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百個のヌクレオチドの長さである。約100個のヌクレオチドよりも大きい核酸は、この方法を使用していくつかのフラグメントとして合成され得る。次いでこのフラグメントは、10ポリペプチドの全長ヌクレオチド配列を形成するために一緒に連結され得る。通常、ポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATG（これは、メチオニン残基をコードする）を有する。このメチオニンは、宿主細胞から産生されるポリペプチドが、宿主細胞から分泌されるように設計されるか否かに依存して、10ポリペプチドの成熟形態に存在してもよいし存在しなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0120】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞における10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の最適な発現のために変更されているコドンを含む。特定のコドンの改変は、発現について選択される10ポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法（例えば、所与の宿主細胞において高度に発現された遺伝子における使用に好ましいコドンを選択すること）によって行われ得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドンの性能について「Ecohigh.cod」のようなコドン頻度表を組み

込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WIによって提供されている。他の有用なコドン頻度表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod」が挙げられる。

【0121】

(ベクターおよび宿主細胞)

2 / 10ヘテロ二量体の発現を意図する場合、10ポリペプチド発現ベクターならびに2ポリペプチドをコードする発現ベクターの両方が、宿主細胞、細胞株、組織、器官、動物または植物に導入され得る(例えば、形質転換、同時形質転換、トランスフェクション、同時トランスフェクション、形質導入、同時形質導入)ことが理解されるべきである。10ポリペプチド発現ベクターのみの、すでに2ポリペプチドを産生する宿主細胞、細胞株、組織、器官、動物または植物への導入は、2 / 10ヘテロ二量体の新たなまたは増大した産生を生じ得ることもまた理解される。上記のように、ヘテロ二量化アッセイにおいて、組換えポリHisおよびFLAGでタグ化した2 / 10ヘテロ二量体を、哺乳動物細胞の同時トランスフェクションによって産生した。ヘテロ二量体糖タンパク質ホルモン(例えば、CG)はまた、例えば、単離されたサブユニットおよび単離されたCG-サブユニットの、適切な条件下における同時インキュベーションの際にインビトロで構築され得る(BlithéおよびIles、Endocrinology、第136巻、903~910頁(1995)を参照のこと)。同様に、2 / 10ヘテロ二量体は、単離された2ポリペプチドおよび単離された10ポリペプチドのインキュベーションの際にインビトロで構築され得る。この結果は、2ポリペプチド、10ポリペプチドおよび2 / 10ヘテロ二量体の混合物であり得る。これらの産物の各々を、従来の方法(例えば、サイズ排除クロマトグラフィーおよび/または免疫親和性クロマトグラフィー)を使用して精製形態で単離し得る。この点において、2ポリペプ

チド単独および 10ポリペプチド単独は、下記のように、哺乳動物細胞から別々に産生および分泌され得る。ヒト 2 - ポリHisタグ化哺乳動物発現ベクターを、293細胞にトランスフェクトし、そして血清を含まない馴化培地を、72時間後に収集した。この馴化培地のウエスタンブロットを、ホースラディッシュペルオキシダーゼに結合した親和性精製した抗 2ウサギポリクローナル抗体 (Linx HRP Rapid Protein Conjugation Kit, カタログ番号K8050-01、Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) (実施例4) でプローブした。ECLウエスタンブロット検出キット (カタログ番号RPN 2106、Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を使用して、強いバンドが観察され、このことは、ヒト 2ポリペプチドが 10ポリペプチドの非存在下で分泌され得たことを示す。ヒト 10 - FLAG - タグ化哺乳動物発現ベクターを、293細胞にトランスフェクトし、そして血漿を含まない馴化培地を72時間後に収集した。この馴化培地のウエスタンブロットを、ビオチン化した抗FLAG M2モノクローナル抗体 (カタログ番号f9291、Sigma, St. Louis, MO) でプローブし、次いで、ストレプトアビジン結合型ホースラディッシュペルオキシダーゼ (RPN 1231, Amersham Life Sciences) でプローブした。ECLウエスタンブロット検出キット (カタログ番号RPN 2106、Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を使用して、強いバンドが観察され、このことは、ヒト 10ポリペプチドが 2ポリペプチドの非存在下で分泌され得たことを示す。

【0122】

10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される (すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である)。10ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫 (バキュロウイルス系) 宿主細胞およ

び/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体が翻訳後修飾(例えば、グリコシル化および/またはホスホリル化)されるか否かに一部依存する。その場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth. Enz., 第185巻(D. V. Goeddel編, Academic Press 1990)を参照のこと。

【0123】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列ならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列(集合的に、「隣接配列」という)は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む:プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタープライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【0124】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列(すなわち、10ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子)を含み得;このオリゴヌクレオチド配列は、ポリHis(例えば、ヘキサHis)、または別の「タグ」(例えば、FLAG、HA(赤血球凝集素インフルエンザウイルス)またはmyc(これに対して、市販の抗体が存在する))をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体のアフィニティー精製のための手段として役立つ。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとして、タグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、引き続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような、種々の手段によって、精製

された 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体から除去され得る。

【0125】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または株由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または株以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、10 ポリペプチド発現を調節するために通常機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、または任意の植物であり得るが但し、隣接配列は、この宿主細胞の機構において機能的であり、そしてこの宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0126】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、10 遺伝子の隣接配列以外の、本発明で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【0127】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、これは、PCRを使用して、および/または適切なオリゴヌクレオチドおよび/または同種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知ではない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子さえも含み得る大きなDNA片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatsworth、CA

)、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0128】

複製起点は、代表的に、市販から購入された原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅を補助する。特定のコピー数までのベクターの増幅は、いくつかの場合において、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の最適な発現のために重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、複製起点は、既知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322(New England Biolabs, Beverly, MA)からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起源(例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルス)は、哺乳動物細胞におけるベクターのクローニングのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ない(例えば、SV40起源は、それが初期プロモーターを含むという理由のみによって、しばしば使用されている)。

【0129】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の3'末端に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメントと、続くポリ-T配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化されるか、またはベクターの一部としての市販からの購入ですらあるが、これはまた、本明細書中に記載された核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0130】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a)原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素(例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン)に対する耐性を与えるか；(b)細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは、(c)複合培地から入手

可能でない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0131】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生のために大いに要求されている遺伝子が、組換え細胞の継続世代の染色体内でタンデムに反復されているプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞の形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが固有に、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように適応される。選択圧を、培地中の選択因子の濃度を連続的に変化させ、それによって選択遺伝子と 10ポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体が、増幅されたDNAから合成される。

【0132】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてShine-Dalgarno配列(原核生物)またはKozak配列(真核生物)によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現される 10ポリペプチドのプロモーターに対して3'側およびコード配列に対して5'側に配置される。Shine-Dalgarno配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン(すなわち、高いA-G含有量を有する)である。多くのShine-Dalgarno配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して、容易に合成され得、原核生物ベクターにおいて使用され得る。

【0133】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞から 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、10核酸分子のコード領域に位

置するか、または直接 10ポリペプチドコード領域の5'側に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能的である任意のシグナル配列が、10核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、10核酸分子に対して同種(天然に存在する)または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大半の場合、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からの10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の分泌は、分泌された10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体からのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入された10核酸分子の一部であり得る。

【0134】

10ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブな10ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列、または、10ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用は本発明の範囲内である。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものであるべきである。ネイティブな10ポリペプチドシグナル配列を認識せず、そしてプロセスもしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、ネイティブな10ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列で十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0135】

真核生物宿主細胞発現系においてグリコシル化が所望されるような、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列(pre-sequence)が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列(pro-sequence

)を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、1位に(成熟タンパク質の最初のアミノ酸と相対的に)、発現に付随する1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全には除去されない可能性がある。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合に所望の10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体のわずかに短縮された(truncate)形態を生じ得る。

【0136】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞(特に、哺乳動物宿主細胞)において産生される場合に特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合に10遺伝子内に天然に存在するものであり得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない場合(大部分のcDNAについて)、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列および10遺伝子に関するイントロンの位置は、イントロンが有効に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、10cDNA分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位に対して3'側であり、かつポリ-A転写終止配列に対して5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を妨害しないように、cDNAの1つの側または他の側(すなわち、5'側または3'側)に配置される。任意の供給源(ウイルス、原核生物および真核生物(植物または動物)を含む)由来のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまた本明細書中に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

【0137】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、各々、代表的には、宿主生物によって認識され、10ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構

造遺伝子（一般的に、約100～1000bp以内）の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、従来、2つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）のうちの1つにグループ化されている。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくつかの変化（例えば、栄養素の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答して、それらの制御下でDNAからの転写の増加したレベルを開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対してほとんど制御しないかまたは全く制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、10ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブな10プロモーター配列は、10核酸分子の増幅および/または発現を指示するために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して多い転写および発現タンパク質のより高い産生を可能とし、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合には異種プロモーターが好ましい。

【0138】

原核生物宿主での使用に適切なプロモーターとしては、 λ -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン（trp）プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた適切である。これらの配列は公開されており、これらの配列により、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNA配列にそれらの配列を連結し得る。

【0139】

酵母宿主での使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞での使用に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）

、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス40 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター (例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター) が挙げられる。

【0140】

10 遺伝子の転写を制御する際に目的となり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40 初期プロモーター領域 (Bernois t および Chambon, 1981, Nature 290:304-10) ; CMV プロモーター ; ラウス肉腫ウイルスの3' 側の長末端反復に含まれるプロモーター (Yamamoto ら, Cell 22:787-97, 1980) ; ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner ら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:144-1445, 1981) ; メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster ら, 1982, Nature 296:39-42, 1982) ; -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villa-Kamaroff ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:3727-3731, 1978) ; または tac プロモーター (DeBoer ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25, 1983)。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている、以下の動物転写制御領域もまた関心が高い：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼ I 遺伝子制御領域 (Swift ら, Cell 38:639-46, 1984; Ornitz ら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986) ; MacDonald, Hepatology 7:425-515, 1987) ; 膵臓 細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域 (Hanahan, 1985, Nature 315:115-22) ; リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl ら, Cell 38:647-58 (1984) ; Adames ら, Nature 318:533-538 (1985) ; Alexan

derら, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-1444 (1987)) ; 精巣細胞、乳房細胞、リンパ系細胞、および肥満細胞において活性なマウス哺乳動物腫瘍ウイルス制御領域 (Lederら, *Cell* 45:485-495, 1986) ; 肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkertら, *Genes and Devel.* 1:268-276, 1987) ; 肝臓において活性な α -フェトタンパク質遺伝子制御領域 (Krumlaufら, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-1648, 1985; Hammerら, *Science* 235:53-58, 1987) ; 肝臓において活性な β -1-抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら, *Genes and Devel.* 1:161-171, 1987) ; 骨髄性細胞において活性な β -グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら, *Nature* 315:338-340, 1985; Kolliasら, *Cell* 46:89-94, 1986) ; 脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら, *Cell* 48:703-712, 1987) ; 骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Sani, *Nature* 314:283-86, 1985) ; ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら, *Science* 234:1372-1378, 1986)。

【0141】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明の10ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用性エレメントである。エンハンサーは、比較的方向および位置に非依存性である。これらは、転写ユニットに対して5'側および3'側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である(例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトタンパク質およびインシュリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエン

ハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、10核酸分子に対して5'側の位置または3'側の位置でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'側に配置される。

【0142】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。所望の隣接配列の1つ以上が予めベクター内に存在しない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0143】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen、San Diego、CA)、pBSII (Stratagene、La Jolla、CA)、pET15 (Novagen、Madison、WI)、pGEX (Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)、pEGFP-N2 (Clontech、Palo Alto、CA)、pETL (BlueBacII、Invitrogen)、pDSR- (PCT公開番号WO 90/14363)ならびにpFastBacDual (Gibco-BRL、Grand Island、NY)が挙げられる。

【0144】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1-ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems、La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPO

TM T A C l o n i n g (登録商標) K i t、P C R 2 . 1 (登録商標) プラスミド誘導体、I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A)、ならびにバキュロウイルス発現系のような哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター (p B a c P A K プラスミド誘導体、C l o n t e c h、P a l o A l t o、C A) が挙げられる。

【0145】

ベクターが構築され、そして 10 ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。10 ポリペプチドについての発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、D E A E - デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、使用される宿主細胞の種類にいくぶん関連する。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、S a m b r o o k ら、上記に記載される。

【0146】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞 (例えば、E . c o l i) または真核生物宿主細胞 (例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合に 10 ポリペプチドまたは 2 / 2 ヘテロ二量体を合成し、これは、続いて、培養培地から (宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合) 収集され得るか、または直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される (そのポリペプチドが分泌されない場合)。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾 (例えば、グリコシル化またはリン酸化)、および生物学的に活性な分子へと折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0147】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) , 1 0 8 0 1 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d , M a n a s s a s , V A

20110-2209から入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)(ATCC番号CCL61)、CHO DHFR(-)細胞(Urlaubら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4216-4220, 1980)、ヒト胚性腎臓(HEK)293または293T細胞(ATCC番号CRL1573)、あるいは3T3細胞(ATCC番号CCL92)のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1細胞株(ATCC番号CRL1650)およびCOS-7細胞株(ATCC番号CRL1651)、およびCV-1細胞株(ATCC番号CCL70)である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびげっ歯類細胞株(形質転換細胞株を含む)が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠失し得るか、または優性に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swissから誘導された3T3株、Balb-cまたはNIHマウス、BHKまたはHakハムスター細胞株が挙げられ、これらは、ATCCから入手可能である。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現に関する分野の当業者にとって公知であり入手可能である。

【0148】

同様に、本発明に適切な宿主細胞として有用なのは細菌細胞である。例えば、E. coli (例えば、HB101(ATCC番号33694)、DH5、DH10、およびMC1061(ATCC番号53338))の種々の菌株は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.などの種々の菌株もまた、本方法において使用され得る。

【0149】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*および*Pichia pastoris*が挙げられる。

【0150】

さらに、望ましい場合には、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら, *Biotechniques*, 14: 810 - 817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 564 - 572 (1993); および Lucklowら, *J. Virol.*, 67: 4566 - 4579 (1993) に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen) である。

【0151】

グリコシル化 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を発現するために、トランスジェニック動物がまた使用され得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物 (例えば、雌ウシまたはヤギ) を使用し、グリコシル化 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を動物の乳汁中に得ることができ。 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を産生するために、植物もまた使用し得るが、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療の用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0152】

(ポリペプチド産生)

10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養分を含む。*E. coli*細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、*Luria Broth (LB)* および/または *Terrific Broth (TB)* が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、*Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)*

)、Minimal Essential Medium (MEM) および / または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株によって示される血清および / または増殖因子を補充され得る。昆虫培養物についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および / または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。

【0153】

代表的に、形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として加えられる。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカーエレメントによって検出される。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に加えらるる化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

【0154】

宿主細胞によって産生される 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体の量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、ウェスタンブロット分析、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、HPLC 分離、免疫沈降、および / または DNA 結合ゲルシフトアッセイのような活性アッセイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0155】

10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体が宿主細胞から分泌されるように設計される場合、10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体の大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体が宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および / または核 (真核生物宿主細胞について) に、あるいは、細胞質ゾル (細菌宿主細胞について) に存在する。

【0156】

宿主細胞の細胞質および/または核(真核生物宿主細胞について)に位置するかまたは細胞質ゾル(細菌宿主細胞について)に位置する10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体について、細胞内物質(グラム陰性細菌についての封入体を含む)は、当業者に公知の任意の標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、均質化、および/または超音波処理、続く遠心分離によって、ペリプラズム/細胞質の含有物を放出するように溶解され得る。

【0157】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体が細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、細胞内皮および/または細胞該膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後にペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、pH極限值で処理され得るか、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のpHで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のpHで、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理して、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、ここで溶解形態の10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびMarstonら, Meth. Enz., 182:264-275(1990)に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

【0158】

いくつかの場合、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、単離の際、生物学的に活性でなくても良い。10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を「再折り畳みする」かまたはその三次構造に変換し、ジスルフィド結合を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解された10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体のあるpH(通常7より上)および特定の濃度のカオトロピック剤(chao-trope)の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、

封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み/酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャッフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン/シスタミン、グルタチオン(GSH)/ジチオビスGSH、塩化銅(II)、ジチオトレイトール(DTT)/ジチアンDTT、および2,2-メルカプトエタノール(bME)/ジチオ-b(ME)が挙げられる。再折り畳みの効率を増加するために共溶媒が使用され得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【0159】

封入体が10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の発現において有意な程度まで形成されない場合、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

【0160】

溶液からの10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の精製は、種々の技術を使用して達成され得る。10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体が、ヘキサヒスチジン(10ポリペプチド-hexaHis、2/10-hexaHisヘテロ二量体)のようなタグまたは他の小さなペプチド(例えば、FLAG(Eastman Kodak Co., New Haven, CT)またはmyc(Invitrogen, Carlsbad, CA))をそのカルボキシ末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグについて高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

【0161】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性を伴

って結合する。従って、ニッケルのアフィニティークラム（例えば、Qiagen（登録商標）ニッケルカラム）は、10ポリペプチド-polyHISまたは2/10-hexaHisヘテロ二量体の精製のために使用され得る。例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology, 節10.11.8, John Wiley and Sons, New York (1993)を参照のこと。

【0162】

さらに、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用を介して精製され得る。

【0163】

したがって、精製のための適切な手段としては、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、電気泳動（ネイティブなゲル電気泳動を含む）、続くゲル溶出、および分取用等電集束法（「Isoprime」machine/technique, Hofer Scientific, San Francisco, CA）が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術が、増加した純度を達成するために組み合わせられ得る。

【0164】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体はまた、Merrifieldら、J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963); Houghtenら、Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132 (1985); およびStewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）によって調製され得る。このような10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さないで合成され得る。化学的

に合成された 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体は、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化されて、ジスルフィド結合を形成し得る。化学的に合成された 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体は、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製される対応する 10ポリペプチド (2にヘテロ二量体化する場合) または 2 / 10ヘテロ二量体に匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体と相互交換可能に使用され得る。

【0165】

本発明に従う 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を得る別の手段は、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体が天然に見出される供給源の組織および / または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の存在が、例えば、対応する組換え的に産生された 10ポリペプチドもしくはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体、または組換え的に産生された 2 / 10ヘテロ二量体またはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

【0166】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体に対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら, Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 12297-12303 (1997)を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。米国特許第5,824,469号もまた参照のこと。これは、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、オリゴヌクレオチドの異種プールを生成する工程を包含し、それぞれが、5'ランダム化配列、中心予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プ

ールは、所望の生物学的活性を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0167】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、確率論的遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0168】

(化学的誘導体)

本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の化学的に改変された誘導体は、本明細書中以下に記載されるこの開示を考慮して、当業者によって調製され得る。このような 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体誘導体は、この 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体に天然で結合した分子の型または位置のいずれかで異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然で結合した化学的な基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号3、その 10様ポリペプチド改変体または 2 / 10ヘテロ二量体のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水環境(例えば、生理学的な環境)下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終産物調製物の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0169】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であ

り得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2 kDa ~ 約100 kDaの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製において、いくつかの分子の質量が、示される分子量より多く、いくらかが少ないことを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5 kDaと約50 kDaの間、より好ましくは、約12 kDaと約40 kDaとの間、そして最も好ましくは、約20 kDaと約35 kDaとの間である。

【0170】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-連結またはO-連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレングリコール（PEG）（これは、モノ-（C₁-C₁₀）、アルコキシ-、またはアリアルオキシ-ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導するために使用されたPEGの形態を含む）、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約6 kD）のデキストラン）、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびビニルアルコール。配列番号3、そのポリペプチド改変体、または2/10ヘテロ二量体のアミノ酸配列を含むポリペプチドの共有結合した多量体を調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【0171】

一般に、化学的誘導体化は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチド誘導体またはヘテロ二量体の化学的誘導体を調製するための方法は、一般に、以下の工程を包含する：（a）配列番号3のアミノ酸配列を含むポリペプチド、もしくはそれらのポリペプチド改変体もしくは2/10ヘテロ二量体が1つ以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルもしくはアルデヒド誘導体）とポリペプチドまたはヘテロ二量体を反応させる工程、および（b）反応生成物を得る工程。最適の反応条件は

、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1つの実施形態において、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体誘導体は、アミノ末端で単一ポリマー分子部分を有し得る。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

【0172】

ポリペプチドまたはヘテロ二量体のペグ化は、当該分野で公知の任意のペグ化反応によって特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Francisら、Focus on Growth Factors、3:4-10(1992)；欧州特許第0154316号；欧州特許第0401384号および米国特許第4,179,337号。例えば、ペグ化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。還元アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。例えば、反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（これは、水溶性である）、またはそのモノC₁-C₁₀アルコキシ誘導体もしくはアリーールオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

【0173】

別の実施形態において、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、ビオチンに化学的に連結され得、そして、結合体化されたビオチン-10ポリペプチド分子またはビオチン-2/10ヘテロ二量体分子は、次いでアビジンに結合され得、4価のアビジン/ビオチン/10ポリペプチド分子またはアビジン/ビオチン/2/10ヘテロ二量体分子を生じる。10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体はまた、ジニトロフェノール(DNP)またはトリニトロフェノール(TNP)に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗-DNPまたは抗-TNP-IgMと共に沈殿して、10価の十量体の結合体を形成する。

【0174】

一般に、本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体誘導体の投与によって、緩和または調節され得る状態は、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体について本明細書中に記載された状態を含む。しかし、本明細書中に開示される 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増大または減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加もしくは減少した半減期）を有し得る。

【0175】

（遺伝子操作した非ヒト動物）

マウス、ラット、または他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、またはヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、ネイティブの 10ポリペプチドをコードする遺伝子は分裂（「ノックアウト」）され、その結果、この遺伝子の発現レベルは、有意に減少するか、または完全に消滅される。このような動物は、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【0176】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物をさらに含み、ここで、この動物の 10遺伝子または異種 10遺伝子のネイティブの形態のいずれかが、この動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT出願番号WO94/28122号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【0177】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、10ポリペプチドの1つ以上に対するプロモーターは、（例えば、相同組換え方法を使用することによって）活性化されるか、または不活化されるかのいずれかであり、ネイティブ 10ポリペプチドの発現のレベルを変更する。

【0178】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物スクリーニングのために使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物に対する薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、10遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生される10ポリペプチドの量は、動物を薬物候補物に曝露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補物の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少させる薬物候補物の能力または病理学的状態を予防または阻害するその能力を試験し得る。別の例において、ポリペプチドのフラグメントのような特定の代謝産物の産生は、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少させる薬物候補物の能力または病理学的状態を予防または阻害するその能力を試験し得る。

【0179】

(マイクロアレイ)

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用されることが理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体(例えば、ガラス)上に配置された核酸の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、その同族mRNAとハイブリダイゼーションするための標的として作用する、単一のDNA種の多数のコピーを有する。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロフィールにおいて、mRNAは、最初に、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素的に変換される。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAは、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に示された別々の遺伝子の発現は、各々の標的DNAに特異的に結合した標識cDNAの量を定量することによって視覚化される。この方法において、数千の遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、高スループットの並行様式で定量され得る。

【0180】

この高スループット発現プロフィールは、本発明の 10 分子に関連して広範の適用を有し、これには、以下が挙げられるが、これに限定されない：治療のための標的としての 10 疾患関連遺伝子の同定および確認； 10 分子およびそのインヒビターの分子毒性；臨床試験のための集団の階層化および代替マーカーの産生；ならびに高スループットスクリーニング（HTS）において、選択化合物の同定を援助することによって、 10 関連低分子薬物の発見を増強すること。

【0181】

（選択的結合因子）

本明細書中で使用される場合、用語「選択的結合因子」とは、1つ以上の 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体に対して特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的な 10 ポリペプチド選択的結合因子または 2 / 10 ヘテロ二量体選択的結合因子は、10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体の特定の部分を結合し得、これにより、10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体の 10 ポリペプチドレセプターまたは 2 / 10 ヘテロ二量体レセプターへの結合を阻害する。

【0182】

10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体を結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナルを含むポリクローナル、モノクローナル（MAb）、組換え、キメラ、ヒト化（例えば、CDR移植化）、ヒト、単鎖、および/または二重特異的、ならびにそれらのフラグメント、改変体、または誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体上のエピトープに結合する抗体のこれらの部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素的切断によって産生された Fab および F(ab') フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組

換えDNA技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現）によって産生されたフラグメントが挙げられる。

【0183】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体に対するポリクローナル抗体は、一般に、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体およびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物（例えば、ウサギまたはマウス）において産生される。10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターのような、免疫化される種において免疫原性であるキャリアタンパク質に結合体化することは、有用であり得る。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採血され、そしてその血清を、抗10ポリペプチド抗体力価または抗2/10ヘテロ二量体抗体力価についてアッセイする。

【0184】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体に対するモノクローナル抗体は、培地中の連続的細胞株によって抗体分子を産生するために提供される、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例は、Kohlerら、Nature 256:495-497(1975)のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor、J. Immunol.、133:3001(1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))が挙げられる。本発明の10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体と反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がまた、本発明によって提供される。

【0185】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る

。1つの実施形態は、「キメラ」抗体であり、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種由来であるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である一方で、この鎖の残りは、別の種由来であるか、または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である。このような抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、これらの抗体のフラグメントもまた含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855(1985)を参照のこと。

【0186】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源からヒト化した抗体に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野で記載される方法(Jonesら、Nature 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature 332:323-327(1998); Verhoeyenら、Science 239:1534-1536(1988))を使用して、げっ歯類の相補性決定領域(CDR)の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域に置換することによって、実施され得る。

【0187】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を結合するヒト抗体がまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用して、このような抗体が、10ポリペプチド抗原または2/10ヘテロ二量体抗原(すなわち、少なくとも6個の連続アミノ酸を有する)を用いて免疫化し、必要に応じてキャリアに結合体化することによって産生される。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551-2555(1993); Jakobovitsら、Nature

362:255-258(1993); Bruggemannら、Year in Immunol.、7:33(1993)を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、その重免疫グロブリン鎖および軽免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖タンパク質および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物(この動物は、完全未満の相補体の改変を有するものである)は、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得るために交雑育種される。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物は、ヒト(例えば、マウスではない)アミノ酸配列(このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む)を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US91/245、PCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1および欧州特許第546073A1に記載される。ヒト抗体はまた、本明細書中に記載されるような宿主細胞中の組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0188】

代替の実施形態において、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリから産生され得る(Hoogenboomら、J.Mol.Biol.227:381(1991); Marksら、J.Mol.Biol.222:581(1991))。これらのプロセスは、糸状のバクテリオファージの表面上の抗体レパートリーの表示を介した免疫選択、および選択した抗原への結合によるファージの引き続く選択を模倣する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これには、このようなアプローチを使用して、MPL-およびmsk-レセプターについて、高親和性でありかつ機能的なアゴニスト抗体の単離が記載される。

【0189】

キメラ抗体、CDR移植化抗体、およびヒト化抗体は、代表的に組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本

明細書中に記載される物質および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）中で産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0190】

本発明の抗-10ポリペプチド抗体または抗-2/10ヘテロ二量体抗体は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の検出および定量的のために、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158頁（CRC Press, Inc., 1987）））において使用され得る。この抗体は、使用されるアッセイ方法に対して、適切である親和性で10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体と結合する。

【0191】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗-10ポリペプチド抗体または抗-2/10ヘテロ二量体抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{125}I ）、蛍光化合物または化学的蛍光化合物（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）、または酵素（アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る（Bayerら、Meth. Enz. 184: 138-63（1990））。

【0192】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体、またはその免疫学的に活性な部分）の限定された量の抗-10ポリペプチド抗体または抗-2/10ヘテロ二量体抗体との結合に関して、試験サンプル検体（10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量

体)と競合する能力に依存する。試験サンプル中の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の量は、抗体と結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、競合前または後に、代表的に免疫化され、その結果、この抗体と結合する標準および検体は、結合しないままの標準および検体から好都合に分離され得る。

【0193】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用に代表的に関連し、各々は、決定および/または定量されるべきタンパク質の異なる免疫部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル検体は、固体支持体上に免疫化される第1抗体によって代表的に結合され、その後、第2抗体が、この検体に結合され、不溶性の3つの部分からなる複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2抗体自体は、検出可能な部分で標識され得るか(直接的なサンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識される抗-免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る(間接的なサンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)(この場合、検出可能な部分は、酵素である)である。

【0194】

抗-10ポリペプチド抗体または抗-2 / 10ヘテロ二量体抗体を含む、選択的結合剤はまた、インビボイメージングのために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流に投与され得、宿主中で標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。

【0195】

抗体を含む、本発明の選択的結合剤は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらは、本発明に従う10ポリペプチドまたは2 / 10ヘテロ二量体の少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかである。1実施形

態中で、本発明のアンタゴニスト抗体は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体に特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロで10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の機能活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合剤（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約50%、および好ましくは、少なくとも約80%まで、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合剤は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得る抗体であり得、これにより、インビトロまたはインビボにおいて10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体活性を阻害または排除する。アゴニストおよびアンタゴニスト抗-10ポリペプチド抗体または2/10ヘテロ二量体抗体を含む、選択的結合剤は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

【0196】

本発明はまた、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体選択的結合剤（例えば、抗体）および生物学的サンプル中で10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体レベルを検出するために有用である他の試薬を含むキットに関する。このような試薬はまた、血清を遮断する検出可能な標識、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、および検出試薬を含み得る。

【0197】

本発明の10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体はまた、「発現クローニング」ストラテジーを使用して、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体レセプターをクローニングするために使用され得る。放射性標識した（¹²⁵ヨウ素）10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体または「アフィニティー/活性タグ化」10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体（例えば、Fc融合体またはアルカリホスファターゼ融合体）が、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体レセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定するための結合アッセイにおいて使用され得る。このような細胞または組織から単離されたRNAを、cDNAに変換し、哺乳動物

発現ベクターにクローニングし、そして哺乳動物細胞（例えば、COSまたは293）にトランスフェクトして、発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射標識化またはタグ化 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を、親和性リガンドとして使用し、このライブラリーから、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体レセプターをその表面上で発現する細胞のサブセットを同定および単離し得る。DNAを、これらの細胞から単離しそして哺乳動物細胞にトランスフェクトして、二次発現ライブラリーを作製し得る。このライブラリーでは、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体レセプターを発現する細胞の割合が、元のライブラリーにおける割合よりも、数倍高い。この富化プロセスは、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を含む単一の組換えクローンが単離されるまで、反復的に繰り返され得る。この10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の単離は、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体シグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発し得るという点で有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体レセプター、抗 10ポリペプチドまたは抗 2 / 10ヘテロ二量体レセプター抗体、小分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、そしてこれらは、以下に列挙される疾患 / 障害の1以上を診断および / または処置するために使用され得る。

【0198】

（10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の活性の他の修飾因子についてのアッセイ）

いくつかの状態において、本発明の10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の活性の修飾因子である分子（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）を同定することが所望され得る。10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を調節する天然または合成分子は、本明細書中に記載されるように、1以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、エキソピボ様式またはインビトロ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

【0199】

「試験分子」とは、本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の活性を調節する（すなわち、増加または減少させる）ための能力について評価される分子を言う。最も一般的に、試験分子は、ポリペプチドまたはヘテロ二量体と直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、10遺伝子発現に影響を与えることによって、または 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体活性を間接的に調節し得ることも企図する。1実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは、約 10^{-8} M、より好ましくは、約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数（*affinity constant*）で 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体と結合する。

【0200】

本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体と相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体は、試験分子と 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体との相互作用が可能な条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の程度が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物中でスクリーニングされ得る。

【0201】

特定の実施形態において、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体アゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得、これらは、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体と相互作用して、その活性を調節する。10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の発現を調節する分子は、本発明の 10ポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、または 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の発現を指向するか制御するか、またはそれに影響を

与える核酸配列に対して相補的である核酸分子、および発現のアンチセンス制御因子として作用する核酸分子を含む。

【0202】

一旦、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体と相互作用すると、一組の試験化合物が、同定されると、これらの分子は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子と10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体との相互作用の測定は、いくつかの形態で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体と共にインキュベートされ、そして10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。

【0203】

試験分子と本発明に従う10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体との相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含む10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の改変形態は、免疫アッセイにおいて使用され得る。

【0204】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体が、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）への10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対する10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の結合の速度および/または程度を増加または減少させる能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1アッセイにおいて、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、マイクロタイタープレートのウェ

ル中に固定化される。次いで、放射標識した 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナー（例えば、ヨウ素化した 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、一時に一方を（いずれかの順序で）または同時にのいずれかで添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射活性を計数して、結合パートナーが 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体に結合する程度を決定し得る。代表的に、分子は、ある濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上のエレメントを欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対して 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーを固定化し、試験分子および放射標識した 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体をインキュベートし、そして 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第18章、Ausubelら編、John Wiley & Sons, New York (1995)を参照のこと。

【0205】

放射性標識に対する代替として、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体またはその各々の結合パートナーは、ビオチンと結合され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、わさびペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））（これらは、比色定量的に検出される）に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体あるいは 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体がまた、使用され得、そしてAPまたはHRPに連結した酵素連結ストレプトアビジンとのインキュベーションに続いて、検出され得る。

【0206】

10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体または 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定され得る。基材 - タンパク質複合体は、相補性タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈殿され得、そして 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体とその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材 - タンパク質複合体はカラム内に固定化され得、試験分子および相補性タンパク質はカラムを通過する。次いで、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体とその結合パートナーとの間の複合体の形成が、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

【0207】

10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体と対応する 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、BIAcoreアッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ））である。BIAcoreシステムは、製造業者によって特定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体または 10ポリペプチド結合パートナーまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーのいずれかの、デキストランコーティングセンサーチップ（これは、検出器に存在する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補性タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補性タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコーティング側に物理的に関連付けられる分子量の変化に基づいて評価され得、この分子量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0208】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、10ポリペプチ

ドまたは 2 / 10ヘテロ二量体と対応する 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載される。

【0209】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体と対応する 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0210】

10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体と対応する 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少される化合物はまた、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体および対応する 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーFのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌまたはげっ歯類の供給源由来である。10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の、対応する 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーを発現する細胞表面への結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッ

セイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0211】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、10遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成される10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実際の影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメントなど）の生成が、疾患または病的状態を引き起こし得るか、またはそれらと関連付けられ得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

【0212】

(10ポリペプチド、2/10ヘテロ二量体および核酸の治療的/診断的適用)

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体についての生物学的機能は、プロラクチン生成細胞、甲状腺、および生殖腺の発達（増殖、分化）の促進における、とりわけ成長因子として作用することが知られている糖タンパク質ホルモンであるFAS、TSH、FSH、LH、およびCGの機能と類似していることが、予想される。これらの糖タンパク質もまた、胎盤、甲状腺、および生殖腺の機能の調節因子としての役割において内分泌ホルモンとして作用する。FASは、胎盤における脱落膜の細胞からプロラクチン分泌を刺激することにおいて役割を果たし、TSHは、甲状腺を介する基礎代謝の調節において主要な役割を果たし、そしてFSH、LH、およびCGは、男性および女性の受精能（fertility）ならびに妊娠において重要な役割を果たす。したがって、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体もまた、基礎代謝の調節、生殖腺

の発達 / 機能、受精能および妊娠において役割を果たす。

【0213】

さらに以下の実施例に示されるように、10ポリペプチドは、脳、肝臓、胎児肝臓、胃、下垂体、結腸、小腸、甲状腺、副腎、膵臓、皮膚、末梢血白血球、脾臓、精巣、および胎盤において発現される。10が内分泌系を造る器官および組織の多くにおいて発現されるという事実は、1つ以上の内分泌系機能の調節および協調における10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体についての重要な役割を示唆する。内分泌系は、代謝、ストレスに対する生理学的応答、および生殖器官の発達および機能に対する主要な制御を発揮することが知られている。

【0214】

下垂体、膵臓、副腎、甲状腺、胃、小腸、結腸、および肝臓における10の発現は、これらの器官または組織の共通の機能、すなわち、代謝およびエネルギー / 栄養恒常性（すなわち、エネルギーバランス、基礎代謝速度、消化、グルコース恒常性、体脂肪の分布、一般的な成長）における、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体についての可能な役割を示す。

【0215】

下垂体および副腎における10の発現は、これらの2つの重要な器官によって補助される重要な機能の1つ、すなわち、種々の環境ストレスおよび生理学的ストレス（例えば、感染、発熱、炎症、飢餓、高血圧および低血圧、不安、ショック）に対処する体の能力における、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体についての可能な役割を示す。10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体についてのこれらの可能な機能と一致しているのは、免疫系の重要な成分であることが知られている細胞および器官（末梢血白血球、脾臓、小腸）における10の発現である。

【0216】

さらに、下垂体、精巣、および胎盤における10の発現は、これらの器官の共有する機能、特に、受精能および妊娠における10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体についての可能な役割を示す。

【0217】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体もまた、脳、肝臓、胃、下垂体、結腸、小腸、甲状腺、副腎、膵臓、皮膚、末梢血白血球、脾臓、精巣、および胎盤に存在する組織または特異化した細胞型の再生（増殖および分化）に関与する成長因子として作用し得る。

【0218】

潜在的10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体機能の3つの主要な領域、すなわち、（1）代謝およびエネルギー/栄養恒常性、（2）ストレスに対する生理学的応答（免疫系機能を含む）、および（3）受精能および妊娠と一致しているのは、10とヘテロ二量体を形成する2が、これらの3つの主要な領域において重要な役割を果たす多くの同様の器官/組織（下垂体前葉、胎盤、膵臓、副腎皮質、腸の陰窩、および胆嚢粘膜）において発現される（以下の実施例2を参照のこと）という事実である。

【0219】

上記の潜在的な機能に基づいて、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、代謝またはエネルギー/栄養恒常性障害の処置および/または診断のために有用であり得る。このような障害の例には、肥満、るいそう症候群（例えば、癌関連悪液質）、筋障害、胃腸障害、糖尿病、成長障害、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化症、および老化が含まれるが、これらに限定されない。代謝またはエネルギー/栄養恒常性障害を含む他の疾患は、本発明の一部である治療および診断的用途の中に含まれる。

【0220】

上記の潜在的な機能に基づいて、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、ストレスに対する生理学的応答に関連する障害（免疫系機能を含む）の処置および/または診断のために有用であり得る。このような障害の例には、高血圧、免疫系不全（例えば、過剰炎症、自己免疫疾患、AIDSのような感染に対する感受性、不良な創傷治癒、乾癬、喘息、関節炎、およびアレルギー）、ショック、不安、および高血圧もしくは低血圧が含まれるが、これらに限定されない。免疫系機能が含まれるが、これに限定されないストレスに対する生理学的

応答が関与する他の疾患もまた、本発明の一部である治療および診断的用途の中に含まれる。

【0221】

上記の潜在的機能に基づいて、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、妊娠および/または生殖器官の発達および機能に関連する障害の処置および/または診断のために有用であり得る。このような障害の例には、不妊、受精能(避妊)、インポテンス、子宮内膜症、閉経、流産、早産(pre-term labor)、未熟分娩(pre-term delivery)が含まれるが、これらに限定されない。妊娠および/または生殖器官の発達および機能に関連する他の疾患もまた、本発明の一部である治療および診断的用途の中に含まれる。

【0222】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体がホルモン/成長因子活性を有するようであるという事実に基づいて、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、細胞増殖および/または分化を増大させることによって処置され得る障害の処置および/または診断のために有用である。このような障害の例には、組織損傷/変性(例えば、癌治療、感染、自己免疫疾患によって引き起こされるようなもの)、老化、および創傷治癒が含まれるが、これらに限定されない。細胞増殖および/または分化を増大することによって処置され得る他の疾患もまた、本発明の一部である治療および診断的用途の中に含まれる。

【0223】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体がホルモン/成長因子活性を有するようであるという事実に基づいて、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は細胞増殖および/または分化を減少させることによって処置され得る障害の処置および/または診断のために有用であり得る。このような障害の例には、癌、過形成、および肥大が含まれるが、これらに限定されない。細胞増殖および/または分化を減少させることによって処置され得る他の疾患もまた、本発明の一部である治療および診断的用途の中に含まれる。

【0224】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の所望でないレベルによって引き起こされるかまたは媒介される他の疾患は、本発明の一部である治療および診断的用途の中に含まれる。例として、このような所望でないレベルには、過剰に上昇したレベルおよび正常以下のレベルが含まれる。

【0225】

マウス2単独、マウス10単独、またはマウス2/10ヘテロ二量体を過剰発現したトランスジェニックマウスが作製された（実施例6を参照のこと）。2/10ヘテロ二量体を過剰発現するトランスジェニックのみが、コントロールマウスと比較して明確な表現型の差異を示した。2/10過剰発現トランスジェニックマウスは、多数の小胞乳頭状腺腫を伴う両側性の甲状腺肥大および結果としての甲状腺機能亢進（上昇した血清T4レベルによって示される）によって特徴付けられる表現型を示した。他の表現型の変化は、全身性甲状腺機能亢進状態に関連することが感じられ、そして穏やかな肝腫、肝細胞性の過形成、およびわずかに減少した血清コレステロールレベル、両側性の腎肥大、および軽度から中程度の白血球増加症（リンパ球が優勢）（実施例6を参照のこと）が含まれていた。したがって、正常マウスの設定において、2/10は明らかに甲状腺刺激ホルモン（TSH）様の活性を有する。マウス2とヒト2との間の高レベルのアミノ酸保存（推定成熟形態（すなわち、シグナルペプチドを含まない））について、88.5%同一性および90.4%類似性）、マウス10とヒト10との間の高レベルのアミノ酸保存（推定成熟形態（すなわち、シグナルペプチドを含まない））について、93.4%同一性および97.2%類似性）、ならびにマウス甲状腺生物学とヒト甲状腺生物学との間の類似性の非常に高いレベルのために、ヒト2/10ヘテロ二量体が、マウス2/10ヘテロ二量体について見出された活性と同じ甲状腺刺激ホルモン（TSH）様活性を有することが予想される。TSH様活性に加えて、2/10は、本明細書中以下でより詳細に記載するように、異なる生理学的設定（すなわち、疾患状態）における、他の、明確な、生物学的効果を有し得る。

【0226】

TSHは、甲状腺ホルモンの産生を制御することにより基礎代謝に影響し、甲

甲状腺癌の検出および処置を増強するため臨床的に用いられる；McEvoy、G. (編)、AHFS Drug Information、pp.2041~2042、American Society of Health-System Pharmacists、Inc.、Bethesda、MD(1998)を参照のこと。さらに、血中TSHレベルを測定するための診断テストは、甲状腺障害が疑われる場合、甲状腺の機能状態を決定するために通常に使用される。ヒト 2 / 10は、TSHと同様の臨床的有用性を有し、甲状腺に関する疾患および障害の処置および診断に対して有用であるようである。さらに、ヒト 2 / 10は、本明細書に記載される他の治療的および診断的用途を有し得る。ヒト 2 / 10選択的結合因子(例えば、抗体)がTSH選択的結合因子と同様の臨床的有用性を有し、したがって、甲状腺に関する疾患および障害の処置および障害に対して有用であることが推測されることは、合理的である。さらに、ヒト 2 / 10選択的結合因子は、本明細書に記載されるような他の治療的および診断的用途を有し得る。

【0227】

(組成物および投与)

治療組成物は、本発明の範囲内である。このような薬学的組成物は、治療有効量の 10ポリペプチド、 2 / 10ヘテロ二量体、または 10核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の1以上の 10ポリペプチド選択的結合因子または 2 / 10ヘテロ二量体選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。

【0228】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0229】

薬学的組成物は、例えば、その組成物のpH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、におい、無菌性、安定性、解離または放出の速度、吸着、または浸透を改

変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム）、緩衝剤（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、複合体化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン）、フィラー、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、味付け剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック（pluronic）；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルベート（例えば、polysorbate 20、polysorbate 80）；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロールまたはチロキサパル（tyloxapal））、安定性増強剤（スクロースまたはソルビトール）、張度増強剤（例えば、アルカリ金属ハロゲン化物（好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、マンニトール、ソルビトール）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的なアジュバント（Remington's Pharmaceutical Sciences（第18版，A.R.Gennaro，編，Mack Publishing Company [1990]））。

【0230】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達

形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体分子の、物理的状态、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0231】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本来水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、適切なビヒクルまたはキャリアは、注射用水、生理学的生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり得、おそらく非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充されている。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH7.0-8.5のTris緩衝液または約pH4.0-5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出)と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

【0232】

本発明の薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達(例えば、経口的に)のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術内にある。

【0233】

処方成分は、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝剤は、生理学的pHまたはわずかに低いpH、典型的には、約5~約8のpH範囲内にこの組成物を維持するために使用される。

【0234】

非経口投与が企図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体分子を含む、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、この滅菌蒸留水中に、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体分子が、滅菌等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物は、所望の分子と、産物の制御されたまたは持続された放出を提供する薬剤（例えば、注入可能なマイクロスフィア、生体侵食性（bio-erodible）粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸）、またはビーズまたはリポソーム）との処方物を含み得、これは、次いで蓄積注射として送達され得る。ヒアルロン酸がまた、使用され得、そしてこれは、循環において、維持された持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

【0235】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体分子は、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。10ポリペプチド、2 / 10ヘテロ二量体、または 10核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧体と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与が、PCT公開番号PCT/US94/001875にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

【0236】

特定の処方物が、経口投与され得ることがまた意図される。本発明の1つの実施形態において、このよう様式で投与される 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体分子が、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身分解が最小化される場合、胃腸管内での点で処方物の活性部分を放出するように設計

され得る。さらなる薬剤が、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体分子の吸収を容易にするために含まれる。希釈剤、味付け剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、およびバインダーがまた、使用され得る。

【0237】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量の10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体分子を含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤は以下を含むが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

【0238】

さらなる薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続または制御送達処方物中に10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を含む処方物を含む。種々の他の持続または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体侵食マイクロスフィアあるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術はまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性マイクロ粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリックスを含む。徐放性マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, *Biopolymers* 22:547-56）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langerら, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277およびLanger, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（La

ngerら, 前出) またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸(欧州特許第133988号)。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-92; および欧州特許第36676号、同第88046号、および同第143949号を参照のこと。

【0239】

インピボ投与のために使用される薬学的組成物は、代表的に滅菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前に、またはそれに続いてのいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器(例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル)内に配置される。

【0240】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態(例えば、凍結乾燥された形態)のいずれかで保存され得る。

【0241】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ(例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ(lyosyringe))を含むキットが含まれる。

【0242】

治療的に使用される薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体分子が使用されてい

る指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および一般的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床家は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し（*titer*）、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までの範囲であり得る。

【0243】

投薬の頻度は、使用される処方物中での10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体分子の薬物動態学的パラメーターに依存する。典型的に、臨床家は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。従って、組成物は、単回用量として、長期にわたって2回以上の用量（これは、同じ量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そして当業者によって慣用的に実施される作業の範囲内にある。適切な投薬量は、適切な用量 - 応答データの使用を介して確認され得る。

【0244】

薬学的組成物の投与の経路は、公知の方法に従い、例えば、経口的にか、静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内もしくは病巣内の経路による注入を介するか、徐放系によるか、または移植デバイスによる。所望される場合、これらの組成物は、ボラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0245】

あるいは、またはさらに、組成物は、膜、スポンジ、または所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織ま

たは器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ポーラスまたは連続的な投与を介し得る。

【0246】

いくつかの場合において、エキソビボ様式において、本発明による薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から取り出された細胞、組織または器官は、これらの細胞、組織、および/または器官が、その後、患者に移植し戻された後に、薬学的組成物に曝露される。

【0247】

他の場合において、本発明の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体は、本明細書中に記載されるような方法を使用して遺伝子操作されて、ポリペプチドまたはヘテロ二量体を発現および分泌する特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得、そして自己、異種 (heterologous)、または異種間 (xenogenic) であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半透性ポリマーの包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるかまたは周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。

【0248】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法 (例えば、相同組換えおよび/または他の組換え産生方法) に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写的にサイレントな 10 遺伝子 (すなわち、過少発現される遺伝子) を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量の 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体を発現する細胞を産生し得る。

【0249】

相同組換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または矯正するように遺伝子を標的化するために元々開発された技術である (Kucherlapa

ti, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol., 36:301, 1989)。この基本的技術は、特定の変異を、哺乳動物ゲノムの特定の領域へ導入するための方法として(Thomasら、Cell, 44:419-428, 1986; ThomasおよびCapecchi, Cell, 51:503-512, 1987; Doetschmanら、Proc. Natl. Acad. Sci., 85:8583-8587, 1988)、または欠損遺伝子内の特定の変異を矯正するための方法として(Doetschmanら、Nature, 330:576-578, 1987)開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号、欧州特許番号第913051号、同第505500号; PCT/US90/07642、国際公開第WO91/09955に記載される。

【0250】

相同組換えを介して、ゲノム中に挿入されるべきDNA配列は、標的化DNAにこのDNA配列を結合することによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的化DNAは、ゲノムDNA領域に相補的である(相同である)ヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に相補的である標的化DNAの小片は、DNA複製プロセスの間に親鎖との接触下に置かれる。共有される相同領域を介して内因性DNAの他の小片とハイブリダイズし、そして従って、組み換わることは、細胞内に挿入されたDNAの一般的な特性である。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに結合された場合、これもまた、新たに合成された鎖に組換えの結果として組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、この新たなDNA配列が、テンプレートとして作用することが可能である。このように、この移入されたDNAは、ゲノム内に組み込まれる。

【0251】

10ポリペプチドと相互作用し得るかまたは10ポリペプチドの発現を制御し得るDNA領域(例えば、隣接配列)が、標的化DNAのこれらの小片に結合される。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサーまたは外因性転写調節エレメントが、所望の10ポリペプチドをコードするDNA

の転写に影響を与えるに十分に近位でかつ十分な方向で、その意図される宿主細胞のゲノムに挿入される。制御エレメントは、宿主細胞ゲノム中に存在するDNAの一部を制御する。従って、所望の10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の発現は、10遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろDNA調節セグメントと結合された標的化DNA（その目的の内因性遺伝子と相同な領域を含む）の使用によって達成され得、この調節セグメントは、10遺伝子の転写について認識可能なシグナルを、その内因性遺伝子配列に提供する。

【0252】

例示的な方法において、細胞内の所望の標的化された遺伝子（すなわち、所望の内因性の細胞遺伝子）の発現は、少なくとも調節配列、エキソンおよびスプライドナー部位を含むDNAの導入による、予め選択された部位でのその細胞ゲノムへの相同組換えを介して変更される。これらの成分は、実際には、これらの成分が、新たな転写単位の産生を生じる（ここで、そのDNA構築物中に存在する調節配列、エキソンおよびスプライドナー部位が、内因性遺伝子に作動的に連結される）様式で染色体（ゲノム）DNA中に導入される。染色体DNAへのこれらの成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変更される。

【0253】

本明細書中に記載されるように、変更された遺伝子発現は、得られたような細胞において通常サイレントな（発現されない）遺伝子を活性化すること（または発現されるのを引き起こすこと）、ならびに得られたような細胞において生理学的に重要なレベルで発現されない遺伝子の発現を増大させることを包含する。この実施形態はさらに、得られたような細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なるように調節または誘導のパターンを変更すること、ならびに得られたような細胞において発現される遺伝子の発現を減少させること（除去することを含む）を包含する。

【0254】

相同組換えを用いて、細胞の内因性10遺伝子からの10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の産生を増大させ得るかまたは生じさせ得る1つ

の方法は、第1に、相同組換えを用いて部位特異的組換え系（例えば、Cre/loxP、FLP/FRT）（Sauer, Current Opinion In Biotechnology, 5:521-527, 1994; Sauer, Methods In Enzymology, 225:890-900, 1993）由来の組換え配列を、細胞の内因性ゲノム 10ポリペプチドコード領域の上流に（すなわち、5'側に）配置することを含む。ゲノム 10ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に相同な組換え部位を含むプラスミドは、この改変された細胞株に、適切なリコンビナーゼ酵素と共に導入される。このリコンビナーゼは、このプラスミドを、プラスミドの組換え部位を介して、その細胞株におけるゲノム 10ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込ませる（BaubonisおよびSauer, Nucleic Acids Res., 21:2025-2029, 1993; O'Gormanら、Science, 251:1351-1355, 1991）。転写を増大させることが公知の任意の隣接配列（例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド内に適切に配置された場合に、新たな転写単位または改変された転写単位を作製するような様式で組み込み、この細胞の内因性 10遺伝子からのデノボまたは増大した 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の産生をもたらす。

【0255】

部位特異的な組換え配列が、その細胞の内因性ゲノム 10ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するためのさらなる方法は、相同組換えを使用して、第2の組換え部位を、この細胞株のゲノムの他の箇所に導入することである。次いで、適切なリコンビナーゼ酵素が、これら2つの組換え部位の細胞株に導入されて、これが、組換え事象（欠失、反転、転移）を引き起こす。この組換え事象は、新たな転写単位または改変された転写単位を作製し、この転写単位が、この細胞の内因性 10遺伝子からのデノボまたは増加した 10ポリペプチドまたは 2 / 10ヘテロ二量体の産生を生じる（Sauer, Current Opinion In Biotechnology, 前出, 1994; Sauer, Methods In Enzymology, 前出, 1

993)。

【0256】

細胞の内因性 10 遺伝子からの 10 ポリペプチドの発現を増加させるかまたは引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内因性 10 遺伝子からのデノボ 10 ポリペプチド産生または増加した 10 ポリペプチド産生を生じる様式で、ある遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加させるかもしくは引き起こすこと、および/またはある遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサー）の発現を減少させることを包含する。この方法は、細胞の内因性 10 遺伝子からのデノボまたは増加した 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体の産生が生じるように、天然には存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的 DNA 結合ドメインを含むポリペプチド）をその細胞に導入することを包含する。

【0257】

本発明は、さらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用な DNA 構築物に関する。特定の実施形態において、例示的な DNA 構築物は、以下を含む：(a) 1 つ以上の標的化配列；(b) 調節配列；(c) エキソン；および (d) 不対 (unpaired) スプライドナー部位。この DNA 構築物における標的化配列は、細胞中の標的遺伝子へのエレメント (a) ~ (d) の取り込みを、エレメント (b) ~ (d) がその内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結されるように、指向する。別の実施形態においては、DNA 構築物は、以下を含む：(a) 1 つ以上の標的化配列、(b) 調節配列、(c) エキソン、(d) スプライドナー部位、(e) イントロン、および (f) スプライスアクセプター部位；ここで、この標的化配列は、エレメント (a) ~ (f) の取り込みを、(b) ~ (f) のエレメントが内因性遺伝子に作動可能に連結されるように、指向する。この標的化配列は、相同組換えが生じる細胞染色体 DNA における予め選択された部位に相同である。この構築物において、エキソンは、一般に、調節配列の 3' 側であり、そしてスプライドナー部位は、エキソンの 3' 側である。

【0258】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中に提示される 10 遺伝子の核酸配

列)が既知である場合には、この遺伝子の選択された領域に相補的なDNA小片は、合成され得るか、またはさもなければ、例えば、その目的の領域に結合する特異的な認識部位でのネイティブDNAの適切な制限処理によって、得られ得る。この小片は、細胞への導入時に標的化配列として作用し、そしてゲノム内のその相同領域とハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションがDNA複製の間に起こる場合、このDNA小片およびこのDNA小片に結合した任意のさらなる配列は、岡崎フラグメントとして作用し、そして新たに合成されたDNAの娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、10ポリペプチドをコードするヌクレオチドを包含し、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

【0259】

10ポリペプチド細胞治療または2/10ヘテロ二量体細胞治療(例えば、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を産生する細胞の移植)もまた意図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態の10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を合成および分泌し得る細胞を移植することを包含する。このような10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の産生細胞は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の天然の産生者である細胞であり得るか、あるいは所望の10ポリペプチドをコードする遺伝子または10ポリペプチドもしくは2/10ヘテロ二量体の発現を増強する遺伝子で形質転換することによって、その10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を産生する能力が増強された、組換え細胞であり得る。このような改変は、その遺伝子を送達するため、ならびにその発現および分泌を促進するのに適したベクターによって、達成され得る。10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を投与される患者において、外来種のポリペプチドの投与によって生じ得るような潜在的な免疫学的反応を最小化するためには、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を産生する天然の細胞が、ヒト起源でありかつヒト10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を産生することが、好ましい。同様に、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を産生する組換え細胞が、ヒト10ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが、好ましい。

【0260】

移植される細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物の細胞は、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の放出を可能にするが患者の免疫系によるかまたは周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する、生体適合性の半透過性のポリマー包皮または膜内で、患者に移植され得る。あるいは、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体を産生するようエキソビボで形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしに、患者に直接移植され得る。

【0261】

生存細胞をカプセル化するための技術は、当該分野において公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびこれらの患者への移植は、慣例的に達成され得る。例えば、Baetgeら(PCT公開番号WO95/05452; PCT/US94/09299)は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のための、遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。これらのカプセルは生体適合性であり、そして容易に回収可能である。これらのカプセルは、プロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化し、これらの細胞は、哺乳動物宿主への移植の際に、インビボでのダウンレギュレーションに供されない。このデバイスは、生存細胞からレシピエント内の特異的な部位への分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号、同第5,011,472号、および同第5,106,627号を参照のこと。生存細胞をカプセル化するための系は、PCT出願番号PCT/US91/00157(Aebischerら)に記載されている。PCT出願番号PCT/US91/00155(Aebischerら); Winnら、1991, Exper. Neurol., 113:322-329, Aebischerら、1991, Exper. Neurol., 111:269-275; および Trescoら、1992, ASAIO, 38:17-23もまた参照のこと。

【0262】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体のインビボおよびインビ

トコ遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の1つの例は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結され得る10ポリペプチドをコードする10遺伝子(ゲノムDNA、cDNA、および/または合成DNAのいずれか)を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内因性遺伝子に対して同種であっても異種であってもよいが、但し、この構築物が挿入される細胞または組織型において、このプロモーターは、活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組み込みのために設計されたDNA分子(例えば、相同組換えのために有用な内因性配列)、組織特異的なプロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子(例えば、細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターによる発現を増強するための転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含み得る。

【0263】

次いで、遺伝子治療DNA構築物は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して、細胞に(エキソビボまたはインビボでのいずれかで)導入され得る。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの手段は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターによる手段である。特定のベクター(例えば、レトロウイルスベクター)は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質内に残る。

【0264】

なお別の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞における10遺伝子の制御された発現のために含まれ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに対する応答の際に、オンにされる。この様式で、治療ポリペプチドは、所望のときに発現され得る。1つの従来制御手段は、小分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質(例えば、DNA結合タンパク質または転写活性化タンパク質)を二量体化するために使用

される、小分子二量体化剤またはラパログ (rapalog) の使用を包含する (PCT公開番号WO 96/41865 (PCT/US96/099486)、WO 97/31898 (PCT/US97/03137)、およびWO 97/31899 (PCT/US95/03157) に記載されるように)。このタンパク質の二量体化を使用して、導入遺伝子の転写を開始し得る。

【0265】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、その細胞の内側で凝集体またはクラスターとして貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、融合タンパク質として発現され、この融合タンパク質は、条件的凝集ドメインを含み、このドメインは、小胞体内での凝集したタンパク質の保持を生じる。貯蔵されたタンパク質は、細胞内で安定でありそして不活性である。しかし、これらのタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去し、これによってこの凝集体またはクラスターを特異的に破壊する薬物 (例えば、小分子リガンド) を投与することによって、放出され得、その結果、これらのタンパク質は、その細胞から分泌され得る。Science 287: 816 - 817 および 826 - 830 (2000) を参照のこと。

【0266】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、以下の系が挙げられるが、これらに限定されない。ミフェプリストン (RU486) が、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。プロゲステロンアンタゴニストに対する、改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインの結合は、2つの転写因子の二量体を形成し、次いで、これらの転写因子が、核を通過してDNAに結合することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、そのレセプターがその天然のリガンドに結合する能力を排除するよう改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系は、米国特許第5,364,791号ならびにPCT公開番号WO96/40911およびWO97/10337に、さらに記載されている。

【0267】

なお別の制御系は、エクジソン (ショウジョウバエのステロイドホルモン) を

使用し、これは、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこのレセプターを活性化する。次いで、このレセプターは、核に転移して、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）を結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するための、トランス活性化ドメイン/DNA結合ドメイン/リガンド結合ドメインを含む。エクジソン系は、米国特許第5,514,578号ならびにPCT公開番号WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162にさらに記載されている。

【0268】

別の制御手段は、ポジティブなテトラサイクリン制御可能トランスアクチベーターを使用する。この系は、転写を活性化させるポリペプチドに連結された、変異tetリプレッサータンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランスアクチベータータンパク質（すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下で、tetオペレーターに結合する）を生じる変異tet R-4アミノ酸変化）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記載されている。

【0269】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、Innovir Laboratories Inc. に対する米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号に記載されている。

【0270】

インビボ遺伝子治療は、10ポリペプチドをコードする遺伝子を、10核酸分子の局所的注射を介してかまたは他の適切なウイルス送達ベクターもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る（Hefti, 1994, Neurobiology, 25:1418-1435）。例えば、本発明の10ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに含まれ得る（例えば、Johnson, PCT公開番号WO95/34670; PCT出願番号PCT/US95/07178）。組換えAAVゲノムは、代表的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結された10ポリペプ

チドをコードするDNA配列に隣接する、AAV逆方向末端反復を含む。

【0271】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、肝炎ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、コロナウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、およびパピローマウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含む、インビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するようインビトロで処理されたヒト細胞の送達による、患者に治療タンパク質を提供するためのプロセスの例を、提供する。遺伝子治療技術の実施のさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号（アデノウイルスベクターを含む）；米国特許第5,672,510号（レトロウイルスベクターを含む）；および米国特許第5,635,399号（サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む）に記載されている。

【0272】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNA送達（直接注入）、レセプター媒介移入（リガンド-DNA複合体）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃）が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的組み込みのために設計されたDNA配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全性の尺度）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,

970, 154号(エレクトロポレーション技術を含む)、PCT公開番号WO 96/40958(核リガンドを含む)、米国特許第5,679,559号(遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する)、米国特許第5,676,954号(リポソームキャリアを含む)、米国特許第5,593,875号(リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する)、および米国特許第4,945,050号(ここで、生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通しそしてこの細胞の内側に取り込まれる速度で推進されるプロセス、を記載する)、およびに記載されている。

【0273】

10 遺伝子治療または細胞治療が、同じまたは異なる細胞における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達をさらに含み得ることがまた意図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス(例えば、上記のカプセル化膜)内に含まれ得るか、または細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0274】

遺伝子治療を介して細胞における内因性 10 ポリペプチド発現を増加させるための手段は、1つ以上のエンハンサーエレメントを 10 ポリペプチドプロモーターに挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、10 遺伝子の転写活性を増加させるよう作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される；この組織においてプロモーター活性化を与えることが既知であるエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、10 ポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「オンにされる」場合には、1 c k プロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、負荷される転写エレメントの機能性部分は、標準的なクローニング技術を使用して、10 ポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る(そして必要に応じて、ベクターおよび/または5' および/または3' 隣接配列などに挿入され得る)。次いで、この構築物(「相同組換え構築物」として公知)が、エキソビボでかまたはインビボでのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0275】

遺伝子治療はまた、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体発現を減少させるために、使用され得る。このような改変は、代表的に、相同組換え法を介して達成される。例えば、不活化について選択された10遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーター片を除去および/または置換するように、操作され得る。例えば、プロモーターの転写アクチベーターのTATAボックスおよび/または結合部位が、標準的な分子生物学の技術を使用して、欠失され得る；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、これによって、対応する10遺伝子の転写を抑制する。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、(調節される10遺伝子と同じ種かまたは関連する種由来の)10ポリペプチドプロモーターの全てまたは関連する部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび/または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドが、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および/または挿入を介して変異される。その結果、TATAボックスおよび/またはアクチベーター結合部位は、活性が減少されているか、または完全に不活性にされている。この構築物はまた、代表的に、その改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブな(内因性の)5'および3'DNA配列に対応する、少なくとも約500塩基のDNAを含む。この構築物は、直接的にかまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介して、適切な細胞に(エキソビボでかまたはインビボでかのいずれかで)導入され得る。代表的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組み込みは、相同組換えを介し、ここで、このプロモーター構築物における5'および3'DNA配列は、ハイブリダイゼーションを介するその内因性染色体DNAへの改変されたプロモーター領域の組み込みを補助するよう作用し得る。

【0276】

(本発明の核酸およびポリペプチドの他の使用)

本発明の核酸分子(それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない

核酸分子を含む)を使用して、10遺伝子および関連する遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術(例えば、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション)により行われ得る。

【0277】

10核酸分子(それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む)は、哺乳動物組織または体液サンプル中の10DNAまたは対応するRNAの存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するための、診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0278】

10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体は、処置される適応症にとって適切な1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤と組合せて(同時に、または連続的に)使用され得る。

【0279】

他の方法もまた、本発明の1つ以上の10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の活性を阻害することが所望される場合に、使用され得る。このような阻害は、発現制御配列(三重ヘリックス形成)また10mRNAに対して相補的でありそしてそれにまたはハイブリダイズする、核酸分子によってもたらされ得る。例えば、選択された10遺伝子の少なくとも部分と相補的な配列を有するアンチセンスDNAまたはRNA分子が細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中で開示されたポリペプチドの配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、各選択された10遺伝子の開始部位(5'末端)と相補的である。次いで、このアンチセンス分子が、対応する10mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳が、妨げられるかまたは減少する。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物中の、10ポリペプチドまたは2/10ヘテロ二量体の減少または不在に関連する情報を提供する。

【0280】

あるいは、遺伝子療法が、1つ以上の10ポリペプチドまたは2/10

ヘテロ二量体のドミナントネガティブインヒビターを作製するために使用され得る。この状況において、各選択された 10 ポリペプチドの変異ポリペプチドをコードするDNAが調製され得、そして本明細書中に記載のウイルス的方法または非ウイルス的方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的には、その生物学的役割において内因性ポリペプチドまたはヘテロ二量体と競合するように設計される。

【0281】

さらに、本発明の 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体（生物学的に活性であっても、またはそうでなくても）は、免疫原として使用され得、すなわち、このポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。（本明細書中に記載の） 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体に結合する選択的結合因子は、インビボ診断およびインビトロ診断の目的で使用され得、この目的としては、体液または細胞サンプル中の 10 ポリペプチドもしくは 2 / 10 ヘテロ二量体を存在を検出するための標識形態での使用が挙げられるが、これに限定されない。この抗体はまた、本明細書中で列挙された疾患および障害を含む、多くの疾患および障害を、予防、処置、または診断するために使用され得る。この抗体は、 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体を特徴づける少なくとも1つの活性を減少させるかまたは遮断するように 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体に結合し得るか、あるいは、この抗体は、 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体を特徴づける少なくとも1つの活性を増大するように（ 10 ポリペプチドまたは 2 / 10 ヘテロ二量体の薬物動態を増大することによるものを含む）、ポリペプチドに結合し得る。

【0282】

E. coli 中のヒト 10 ポリペプチドコードするcDNAを、American Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 20110-2209へ、1999年12月28日に、登録番号PTA-1210のもと寄託した。

【0283】

以下の実施例は、例示目的のみが意図され、いかなる様式においても本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0284】

(実施例1：ヒト 10をコードするDNA)

CG- (絨毛性生殖腺刺激ホルモン) - サブユニットのアミノ酸配列で、社内製作した、GenBankに存在する公開されたヒトゲノム配列から導出したVirtual Proteinデータベースに対して、BLASTを実行した。CG- のC末端側半分と有意な相同性を有する45アミノ酸領域を含む仮想タンパク質を、同定した。この45アミノ酸ストレッチをコードするヒトゲノム配列の短い(135塩基対)領域は、160キロ塩基対を超えるGenBankのヒトゲノムDNA配列(登録番号AL049871)に由来した。この135塩基対の配列のすぐ5'側のゲノム配列の8キロ塩基対ストレッチを解析することによって、CG- のN末端側半分に対して有意な相同性を有する(かつフレームシフトを含む)領域を同定した。この新規遺伝子のヌクレオチド配列を、このゲノム配列から編成した。この編成した遺伝子のアミノ酸配列は、4つの既知のヒト糖タンパク質ホルモンのサブユニットポリペプチドに対して有意な相同性を有し、そしてN末端推定シグナルペプチドを有し、これは、糖タンパク質ホルモンファミリーの新しい様メンバーである新規のヒト遺伝子と一致した。N末端側半分とC末端側半分の2つの推定コードエクソンの間に位置する4.5kbのイントロンが存在した。種々の組織供給源由来のcDNAのイントロンスパニング(intron spanning)PCR(以下の組織発現、-10の節を参照のこと)は、10が、下垂体を含む多数の組織において発現されることを示した。

【0285】

10の全コード領域(ATGからTGA停止コドンまで)および3'UTR(非翻訳領域)の一部を、以下の反応混合物およびPCR条件を用いたPCRによって1つのフラグメントとしてクローニングした：

テンプレート：10マイクロリットルのHuman Pituitary Ma

rathon Ready cDNA (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号7424-1)。

順方向プライマー: 5' - ATGAAGCTGGCATTCTCTTCCTT - 3' (配列番号4)。

逆方向プライマー: 5' - GCATGTGCTGCTCACACAGGT - 3' (配列番号5)。

各プライマーの最終濃度: 1.0マイクロモル濃度。

dNTPの最終濃度: 200マイクロモル濃度。

5単位のPfuポリメラーゼ (Stratagene, La Jolla, CA)。

10マイクロリットルの10xPfu反応緩衝液 (Stratagene, La Jolla, CA)。

10マイクロリットルのGC melt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCRキット; カタログ番号K1907-1)。

最終反応容量: 100マイクロリットル。

【0286】

サイクル条件: 94 で60秒間、続いて94 (10秒間)、60 (20秒間)、72 (90秒間)を45サイクル、次いで45番目のサイクルの終わりに、72 で7分間のインキュベーション、次いで94 (10秒間)、60 (20秒間)、72 (90秒間)をさらに10サイクル、次いでこのさらなる10番目のサイクルの終わりに72 で7分間のインキュベーション。

【0287】

PCR反応物をアガロースゲルに泳動し、そして1本のバンドが見られた。このDNAバンドをpPCR-Script AMP (Stratagene)中にクローニングした。得られたクローンのうちの1つにおける挿入物の配列は、

10の全コード領域 (ATGからTGA停止コドンまで) および3' UTR (非翻訳領域)の一部を含む、配列番号2の配列である。

【0288】

以下は、公に利用可能なデータベースからの 10 配列のリストおよび説明である：

GenBank登録番号AL049871：170キロ塩基対のヒトゲノム配列。この記録にはエキソンも遺伝子も相同性も同定されておらず、そして 10 の全コード領域の配列は介在配列によって破壊されている。

【0289】

GenBank登録番号AL118555：126キロ塩基対のヒトゲノム配列。この記録にはエキソンも遺伝子も相同性も同定されておらず、そして 10 の全コード領域の配列は介在配列によって破壊されている。

【0290】

(実施例2：組織発現、 - 10)

PCRフラグメントをプローブとして用いて、種々のHuman Multiple Tissue Northern Blots (Clontech Inc., Palo Alto, CA) についてハイブリダイゼーションシグナルを得ることは可能でなかった。イントロンスパニングPCRを用いて、 - 10 の発現パターンを以下の通りに決定した。

【0291】

Human Sure-RACE Panels (Origene Technologies, Inc., Rockville, MD; カタログ番号HRAA-101) について、cDNAサンプルは、脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、結腸、肺、小腸、筋肉、胃、精巣、胎盤、下垂体、甲状腺、副腎、膵臓、卵巣、子宮、前立腺、末梢血白血球、胎児脳、胎児肝臓、脂肪および乳腺を示した。各cDNAサンプルは、DNAの完全に乾燥したペレットの形態で別々のチューブ内にあった。この反応混合物は以下の通りに構成されていた：

順方向プライマー：5' - CTGCAGGTGCCTTCGGATC - 3' (配列番号6)；

逆方向プライマー：5' - GCATGTGCTGCTCACACAGGT - 3' (配列番号5)；

各プライマーの量：0.5ピコモル；

dNTPの最終濃度：200マイクロモル濃度；

2.5マイクロリットルのGC melt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCRキット；カタログ番号K1907-1)；

2.5単位のTaq (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; PCR Core Kit；カタログ番号1578 553)；

2.5マイクロリットルの10×PCR反応緩衝液 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; PCR Core Kit；カタログ番号1578 553)。

【0292】

各cDNAサンプルについて、上記の反応混合物を、25マイクロリットルの容量にし、そして20マイクロリットルのこの混合物を、完全に乾燥したcDNAペレットに添加した。PCR条件は以下の通りであった：94℃にて60秒間、続いて94℃（10秒間）および72℃（40秒間）を5サイクル、続いて94℃（10秒間）および70℃（40秒間）を5サイクル、続いて94℃（10秒間）および68℃（40秒間）を35サイクル、次いで続いて68℃で7分間。

【0293】

次いで、PCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって分析した。10の発現を示す293塩基対の正確なサイズのPCR産物が、結腸、小腸、精巣、下垂体および胎児肝臓に見出された。

【0294】

Human Rapid-Scan Plate (Origene Technologies, Inc., Rockville MD; カタログ番号HSCA-101) について、cDNAサンプルは、脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、結腸、肺、小腸、筋肉、胃、精巣、胎盤、唾液腺、甲状腺、副腎、膵臓、卵巣、子宮、前立腺、皮膚、末梢血白血球、骨髄、胎児脳および胎児肝臓を示した。各cDNAサンプルは、DNAの完全に乾燥したペレットの形態で別々のチューブ内

にあった。

【0295】

利用した反応混合物は以下の通りであった：

順方向プライマー：5' - CTGCAGGTGCCTTCGGATC - 3' (配列番号6)；

逆方向プライマー：5' - GCATGTGCTGCTCACACAGGT - 3' (配列番号5)；

各プライマーの量：0.5ピコモル；

dNTPの最終濃度：200マイクロモル濃度；

2.5マイクロリットルのGC melt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCRキット；カタログ番号K1907-1)；

2.5単位のTaq (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; PCR Core Kit；カタログ番号1578 553)；

2.5マイクロリットルの10×PCR反応緩衝液 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN; PCR Core Kit；カタログ番号1578 553)。

【0296】

各cDNAサンプルについて、上記の反応混合物を2.5マイクロリットルの容量にし、次いで20マイクロリットルのこの混合物を、完全に乾燥したcDNAペレットに添加した。PCR条件は以下の通りであった：94℃で60秒間、続いて94℃(10秒間)、72℃(40秒間)を5サイクル、次いで続いて94℃(10秒間)、70℃(40秒間)を5サイクル、次いで続いて94℃(10秒間)、68℃(40秒間)を35サイクル、次いで続いて68℃で7分間。

【0297】

次いで、PCR産物をアガロースゲル電気泳動によって分析した。10の発現を示す、293塩基対の正確なサイズのPCR産物は、脳、脾臓、肝臓、結腸、胃、胎盤、甲状腺、副腎、膵臓、皮膚および末梢血白血球において見出された

。

【0298】

Human Sure-RACE Panelsからの発現の結果とHuman Rapid-Scan Plateからの発現の結果とを組み合わせると、10が脳、肝臓、胎児肝臓、胃、下垂体、結腸、小腸、甲状腺、副腎、膵臓、皮膚、末梢血白血球、脾臓、精巣および胎盤において発現されることが示された

。

【0299】

(実施例3：組織発現、 2)

ノーザン分析を行って、 2の発現パターンを決定した。ノーザンのためのプローブは、390塩基対のPCR産物(WO99/41377による配列番号1のヌクレオチド56～445に対応する)であった。このPCR産物を、466塩基対のPCR中間体を介して以下の通りに生成した：

PCRを最初に用い、以下の反応混合物およびPCR条件を用いて、ヒト精巣cDNAから 2の466塩基対のフラグメントをクローニングした：

テンプレート：10マイクロリットルのHuman Testis Marathon Ready cDNA(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA;カタログ番号7414-1)；

順方向プライマー：5' - GAGACATCTCCCCACTGTGTTT - 3' (配列番号7)；

逆方向プライマー：5' - GTTTCCCCCAACAGAATGTCAA - 3' (配列番号8)；

各プライマーの最終濃度：1.0マイクロモル濃度；

dNTPの最終濃度：200マイクロモル濃度；

5単位のPfuポリメラーゼ；

最終反応容量：100マイクロリットル；

サイクル条件：94 で60秒間、続いて94 (10秒間)、60 (30秒間)、72 (60秒間)を35サイクル、次いで35回目のサイクルの最後に72 で5分間のインキュベーション。

【0300】

PCR反応物をアガロースゲルで泳動し、そして4本の別々のバンドが見られた。複数のバンドが、Human Testis Marathon Ready cDNA中に存在する夾雑ヒトゲノムDNAのPCR増幅から生じた。466塩基対のPCR産物をアガロースゲルから単離し、そしてクローニングした。466塩基対の配列を含むプラスミドクローンを、以下の反応混合物およびPCR条件を用い、390塩基対のPCRフラグメントを生成するためのテンプレートとして用いた：

テンプレート：上記の466塩基対の配列を含む10ピコグラムのプラスミドクローン；

順方向プライマー：5' - ATGCCTATGGCGTCCCCTCAAAC - 3' (配列番号9)；

逆方向プライマー：5' - CTAGTAGCGAGAGAGGCGACACA TGTCA - 3' (配列番号10)；

各プライマーの最終濃度：1.0マイクロモル濃度；

dNTPの最終濃度：200マイクロモル濃度；

10単位のTaqポリメラーゼ；

最終反応容量：100マイクロリットル；

サイクル条件：94 で60秒間、続いて94 (10秒間)、68 (60秒間)を35サイクル、次いで35番目のサイクルの終わりに、68 で6分間のインキュベーション。

【0301】

次いで、390塩基対のPCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって精製した。このPCRフラグメントを、³²Pを用いて標識化し、そして以下のような高いストリンジェントな条件を使用して、種々のClontechヒト複数組織ノーザンブロット(Human Multiple Tissue Northern Blot)示される組織/細胞は、以下であった：膵臓、副腎髄質、甲状腺、副腎皮質、精巣、胸腺、小腸、胃、脾臓、前立腺、子宮、結腸、末梢白血球、脳、心臓、骨格筋、腎臓、肝臓、胎盤および肺)ならびに下垂体mRN

Aで作製されたノーザンブロットにハイブリダイズさせた。

【0302】

ハイブリダイゼーションは、Clontech「ExpressHyb ハイブリダイゼーション溶液」を使用して68℃で1時間であった。このブロットは、2×SSC、0.1% SDS中で室温で2回、各回20分間洗浄した。次いで、ブロットを、0.1×SSC、0.1% SDS中で50℃で10分間洗浄し、次いでフィルムに曝露した。

【0303】

単一のバンドを示す強いシグナルを、膵臓mRNAのレーンおよび下垂体mRNAレーンにおいて観察した。有意により弱いシグナルを、胎盤mRNAのレーンにおいて観察した。

【0304】

インサイチュハイブリダイゼーションによって 2 遺伝子発現の位置をさらに決定した。正常胚性 (E10.5 ~ E18.5) および成体マウス組織ならびに成体アカゲザル組織のパネルを、4%パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィンに包埋し、そして5 µmの切片にする。インサイチュハイブリダイゼーションの前に、組織を0.2 MのHClで透過化処理し、次いでプロテイナーゼKで消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化する。切片に、マウス 2 配列かまたはヒト 2 配列 (アカゲザル組織用) かのいずれかに相補的な³³P 標識化アンチセンスRNAプローブおよびセンス (コントロール) プローブを55℃で一晩ハイブリダイズさせた。このアンチセンスおよびセンス³³P 標識化RNAプローブを、プラスミドDNAのインビトロ転写物によって得た。このプラスミドcDNAは、マウス 2 DNA (public WashU-HHMI Mouse EST Projectからの細菌クローン番号1224990) かまたはヒト 2 cDNA (上記のPCRによって生成された390塩基対のヒト 2 コード領域配列を含むプラスミドクローン) かのいずれかを含む。

【0305】

ハイブリダイゼーション後、切片を、緩衝液で洗浄し、RNase Aで処理し

てハイブリダイズされなかったプローブを除去し、次いで0.1×SSC中で55での高いストリンジェシーな洗浄に供した。スライドを、Kodak NTB2エマルジョンに浸漬し、4で2~3週間曝露し、現像し、次いで対比染色をした。切片を、組織形態およびハイブリダイゼーションシグナルを同時に評価することを可能にするために、暗視野および標準の照明で調べた。次いで以下の組織を調べた：

マウス組織：脳（1矢状切断、2冠状切断）；GI管（食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、近位結腸および遠位結腸）；下垂体；肝臓；肺；心臓；脾臓；胸腺；リンパ節；腎臓；副腎；膀胱；膵臓；唾液腺；雄性生殖器官および雌性生殖器官（雌の卵巣、卵管および子宮；雄の精巣、精巣上体、前立腺、精囊および精管）；BATおよびWAT（皮下、腎周囲）；骨（大腿骨）；皮膚；胸部；ならびに骨格筋。

【0306】

アカゲザル組織：副腎；肝臓；胆嚢；腸；膵臓；および唾液腺。

【0307】

マウスとヒトの両方のアンチセンスプローブは、センス標準コントロール用いで見られる非常に低いレベルのバックグラウンドより高い検出可能な陽性シグナルを生じた。マウス胚において、シグナルは、E8.5~E18.5までのいかなる主要な器官においても観察されなかった。E15.5およびE18.5において、シグナルは、発生中の頭部の骨および歯のいくつかに隣接した点状細胞に存在した。成体マウスにおいて、中程度のレベルのシグナルが、副腎皮質に存在した。より低いレベルのシグナルが、下垂体の前葉および中葉ならびに陰窩のレベルにおける腸上皮において検出可能であった。さらに、粒密度は、精巣の精細管内の発生中の精子において、および卵巣における発生中の卵胞の周りの顆粒膜細胞においてバックグラウンドよりわずかに高かった。

【0308】

アカゲザル組織において、中程度のシグナルが、副腎皮質、胆嚢上皮および主に陰窩のレベルにおける腸上皮において見られた。

【0309】

2 ノーザンと 2 インサイチュ分析の発現結果の組み合わせは、2 が、下垂体前葉、胎盤、膵臓、副腎皮質、腸の陰窩および胆嚢粘膜に発現されることを示す。

【0310】

(実施例4： 2 に対する抗体)

ウサギポリクローナル抗体を、キーホールリンペントヘモシアニン(カタログ番号77605 Pierce Inc., Rockford, IL)に結合体化されたペプチドCSPRYSVLVASGYRHN(配列番号28)を用いてウサギを免疫することによって 2 に対して産生した。このペプチドは、C-末端アミドを用いて合成し、それ故、そのC末端は、COOHではなく、CONH₂であった。ペプチド配列のRYSVLVASGYRHN部分は、ヒト 2 とマウス 2 との間で全体的に保存されている。これらの抗体が、ヒト 2 およびマウス 2 に結合し得るので、この領域を選択した。これらの抗体を、ペプチド抗原(配列番号28)が結合されているカラム(SulfoLink Kit, カタログ番号44895, Pierce Inc., Rockford, IL)上でウサギ血清からアフィニティー精製した。ヒト 2 - ポリHis - タグ哺乳動物発現ベクターまたはヒト 2 - サブユニット - ポリHis - タグ哺乳動物発現ベクターのいずれかをトランスフェクトした293細胞から回収された馴化培地のウエスタンブロット分析は、これらのアフィニティー精製されたポリクローナル抗体が、2 ポリペプチドに対して高い特異性を有し、そして サブユニットと交差反応しないことを実証した。

【0311】

(実施例5：マウス 2 - 10 をコードするDNA)

種々のヒト 2 - 10 cDNAプローブを使用して、高密度フィルターに整列されたマウスゲノム129SvJ BACライブラリー(カタログ番号FBAC-4431, Genome System, St. Louis, MO)をプローブした。プレート番号218 - ウェル番号P22におけるマウスBACクローンを得た。(カタログ番号FBAC-4432, Genome System, St. Louis, MO)このBACクローンからの10kbのHindIIIサ

ブフラグメントは、ヒト - 10 cDNAプローブに強くハイブリダイズした。この10kbのHindIIIフラグメントを、pBluescriptII-KS(-)にサブクローニングし、そして全体的に配列決定をした。この10kbのマウスゲノム配列のコンピューター分析を使用して、ヒト - 10のマウスオルソログをコードする2つのエクソンを同定した。

【0312】

プライマーを、この電子配列から設計して以下のようにマウス - 10 cDNAをクローニングした。

【0313】

テンプレート：20µlのマウス精巣Marathon Ready cDNA (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号7455-1)

順方向プライマー：5' - ATTACTAGTTCCACCATGAAGTTGGTATACCTTGTCCTT - 3' (配列番号14) ;

逆方向プライマー：5' - TTAATAATCGATCGTCAGATGGTCTCACACTCAGTG - 3' (配列番号15) ;

各プライマーの最終濃度：1.0µmol

PCRキット：Expand High Fidelity PCR System (カタログ番号1732641, Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN)

最終反応容積：50µl ;

サイクリング条件：94 で60秒間、次いで94 (10秒間)、65 (20秒間)、72 (40秒間)の55サイクル、次いで55サイクル目の終了時に72 で7分間のインキュベーション。

【0314】

次いで、0.4kbのPCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって精製し、そしてpCR2.1 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)にクローニングした。マウス - 10の完全コード領域cDNA (配列番号12)を含むクローンを、配列決定によって同定した。

【0315】

(実施例6： 2単独、 10単独を過剰発現するおよび 2および 10を同時発現するトランスジェニックマウスの産生ならびに分析)

ヒトa p oリポタンパク質Eプロモーターから 2単独、 10単独を過剰発現するおよび 2および 10を同時発現するトランスジェニックマウスを、本質的に、以前に記載されるように産生した(Simon et al., 1997, Cell 89巻 309~319頁)。このヒトa p o Eプロモーターベクターは、トランスジェニックマウスにおいて高レベルの、肝臓特異的な遺伝子発現を指向し、そして、以前のように使用して、マウスの循環中に高レベルのトランスジーンコード分泌タンパク質をコードするを有するトランスジェニックマウスを産生した。以下に記載される全ての表現型分析に関して、非トランスジェニックマウスコントロールは、該当のトランスジェニック発現体と同じ一連のマイクロインジェクションの間に産生されたマウスであった。

【0316】

ゲノム(すなわち、 2のエキソンおよびイントロンおよび 10のエキソンおよびイントロンを含む)トランスジーンを、発現を最大化するトランスジェニックを産生するために使用した。さらに、全ての場合において、K o z a k部位(C C A C C)を、開始部位A T Gの直ぐ5'側に操作した。

【0317】

ヒトa p o Eプロモーター発現ベクターは、H C R(肝臓特異的エンハンサーエレメント)、その後a p o Eプロモーターおよび第1のイントロン(a p o E 5' U T Rにおいて)、その後S V 4 0 ポリA - シグナル/ターミネーターを含む。このベクターのa p o Eプロモーター - 第1のイントロンとS V 4 0 ポリA - シグナル/ターミネーター領域との間に、遺伝子の直接的なクローニングのための固有のS p e I部位およびS f i I部位(P v u Iと適合性)が存在する。

【0318】

以下の手順を使用して、「マウスゲノム 2ヒトa p o E発現ベクタートランスジーン」を産生した：

BAC Mouse ES (129 SvJ) Genomic Screening Kit (カタログ番号BDTW-7460, Genome System, St. Louis, MO) のプールを、マウス 2 に特異的なプライマーを使用するPCRによってスクリーニングした。プレート番号44 - ウェル番号19におけるマウスBACクローンを得た (カタログ番号FBAC-4432, Genome System, St. Louis, MO)。このBACクローンからの12 kbのXbaIサブフラグメントは、マウス 2 cDNAプローブに強くハイブリダイズした。この12 kbのXbaIフラグメントを、pBluescript II - KS (-) (Stratagene Inc, La Jolla, CA) にサブクローニングし、そして全体的に配列決定した。この12 - kbマウスのゲノム配列のコンピューター分析を使用して、3つの 2コードエキソンを同定した。

【0319】

プライマーを設計して、以下のように完全マウスゲノム 2コード配列 (開始ATGから停止TAG; 配列番号18) を増幅した。

【0320】

テンプレート: 5 ngの12 kbのXbaI pBluescript II - KS (-) クローンDNA;

順方向プライマー: 5' - CCGCACTAGTTCCACCATGCCCA
TGGCACCCACGAGT - 3' (配列番号16);

逆方向プライマー: 5' - GCGGCGTTTCGATCGCTAGTAGCG
GGAGAAACGGCACATATC - 3' (配列番号17);

各プライマーの最終濃度: 1.0 μ mol

PCRキット: Pfu DNA Polymeraseキット (Stratagene, La Jolla, CA)

最終反応容積: 50 ml;

サイクリング条件: 94 °C で60秒間、次いで94 °C (10秒間)、60 °C (20秒間) 72 °C (180秒間) の40サイクル、次いで40サイクル目の終了時に72 °C で4分間のインキュベーション。

【0321】

0.8 kbのPCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって精製し、Spe IおよびPvu Iを用いて切断し、そしてSpe I - Sfi I切断したHitapo E発現ベクターにクローニングした。正確な全ゲノムコード領域マウス 2を含むクローンを、配列決定によって同定した。この「マウスゲノム 2Hitapo E発現ベクタートランスジーン」クローンからのDNAを、Cla IとApa L Iで消化した；4 kbのバンドを、ゲル電気泳動によって精製し、そしてこれを使用して、以前に記載のようにトランスジェニックマウスを産生した（Simon et al., 1997, Cell 89巻、309~319頁）。

【0322】

トランスジェニックマウスを以下のようにPCRによって同定した：

テンプレート：耳パンチDNA。

【0323】

順方向プライマー：5' - GCCTCTAGAAAGAGCTGGGAC - 3'
'（配列番号19）；

逆方向プライマー：5' - CGCCGTGTTCCATTTATGAGC - 3'
'（配列番号20）；

各プライマーの最終濃度：1.0 μmol

PCRキット：Ready-to-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)

最終反応容積：25 μl；

サイクリング条件：94（60秒）、62（20秒）、72（30秒）
の30サイクル。

【0324】

PCR産物の電気泳動において、0.37 kbバンドの存在は、特定のマウスが、トランスジェニックあることを示した。

【0325】

2を過剰発現するトランスジェニックを、種々のPCRで同定されたトラン

スジェニックから得られた血漿のウエスタンブロット（実施例4において上記される、アフィニティー精製された抗 $\alpha 2$ ポリクローナル抗体を使用する）によって同定した。6匹の $\alpha 2$ 過剰発現体（番号7、8、26、28、156および186）および6匹の非トランスジェニックコントロールマウス（番号10、11、12、18、20、21）を、表現型的に分析した。全てのマウスを、収集する1時間前に50mg/kgのBrdUを注射し、エックス線写真をとり、そして屠殺した。マウスを、12週齢で屠殺した。有意な知見は、検死の間に見られなかった。

【0326】

全てのマウスにおいて、体重および選択した器官の重量を測り、血液を、血液学および血清化学のために採取し、そして器官を、組織学的分析およびBrdU標識化のために収集した。

【0327】

肝臓、胆嚢、脾臓、肺、脳、下垂体、心臓、腎臓、副腎、胃、小腸、膵臓、盲腸、結腸、腸間膜リンパ節、皮膚、乳腺、気管、食道、甲状腺、上皮小体、唾液腺、膀胱、卵巣または精巣、子宮または前立腺および精嚢、骨および骨髄のH&E染色切片を調べた。

【0328】

$\alpha 2$ 過剰発現体トランスジェニックマウスと非トランスジェニックコントロールマウスとの間には、平均または個々の動物の器官重量、血液学的値、臨床化学的値または組織学的知見における生物学的に意義のある差異は存在しなかった。言い換えれば、 $\alpha 2$ 過剰発現体トランスジェニックマウスは、表現型を有さなかった。

【0329】

以下の手順を使用して、「マウスゲノム $\alpha 10$ ヒトapoE発現ベクタートランスジェーン」を産生した。

【0330】

プライマーを設計して、以下のように完全マウスゲノム $\alpha 10$ コード配列を増幅した（開始コドンATG～停止コドンTGA；配列番号23）：

テンプレート：10 ngの実施例5に記載されるマウスゲノム 10の10 kb HindIII pBluescriptII-KS(-)クローンDNA。

【0331】

順方向プライマー：5' - ATTACTAGTTCCACCATGAAGTTGGTATACCTTGTCCTT - 3' (配列番号21)；

逆方向プライマー：5' - TTAATAATCGATCGTCAGATGGTCTCACACTCAGTG - 3' (配列番号22)；

各プライマーの終濃度：1.0 μmol

PCRキット：PfuTurbo DNA Polymeraseキット (Stratagene, La Jolla, CA)

最終反応容積：50 μl

サイクリング条件：92 で60秒間、次いで、92 (10秒間)、65 (20秒間)、68 (4分間)の15サイクル。

【0332】

3 kbのPCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって精製し、SpeIおよびPvuIで切断して、SpeI-SfiIで切断したヒトapoE発現ベクターにクローニングした。マウス 10コード領域のゲノムの正確な全長を含む「マウスゲノム 10ヒトapoE発現ベクター導入遺伝子」クローンを、配列決定によって同定した。

【0333】

次いで、以下の手順を使用して、組み合わされた「マウスゲノム 10マウスゲノム 2ヒトapoE発現ベクター導入遺伝子」を作製した。

【0334】

「マウスゲノム 10ヒトapoE発現ベクター導入遺伝子」クローンDNAを、HindIIIおよびSacIIで切断し、そして末端を、DNAポリメラーゼI Large (Klenow) Fragment (New England Biolabs, Beverly, MA)で平滑にした。5.6 kbのフラグメントをゲル精製して、HincIIで切断したpBluescript I

I K S (-) にクローニングした。p B l u e s c r i p t I I K S (-) ポリリンカーのH i n d I I I 部位に隣接するカセットのS V 4 0 ポリAシグナル/ターミネーター領域を有する方向での、5 . 6 k b の「マウスゲノム 1 0 ヒト a p o E 発現カセット」を有するクローンを、同定した。このクローン由来のDNAを、H i n d I I I およびS c a I I によって切断し、そして上記の「マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現ベクター導入遺伝子」クローンから単離された、3 . 4 k b のH i n d I I I - S a c I I 「マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現カセット」に連結させた。最終の1 1 . 8 k b の「マウスゲノム 1 0 マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現ベクター導入遺伝子」構築物は、p B l u e s c r i p t I I K S (-) に縦列で(すなわち、両方とも同じ転写方向で)クローニングされた「マウスゲノム 1 0 ヒト a p o E 発現カセット」および「マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現カセット」からなる。この構築物において、1 0 および 2 の各々は、発現目的のための、それら自身のH C R / a p o E プロモーターおよびS V 4 0 ポリAシグナル/ターミネーターを有する。

【0335】

この「マウスゲノム 1 0 マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現ベクター導入遺伝子」クローン由来のDNAを、B s s H I I で消化した；9 k b のバンドを、ゲル電気泳動で精製し、そして以前に記載された(S i m o n e t ら、1 9 9 7 、C e l l 第89巻 309 - 319頁)トランスジェニックマウスを作製するために使用した。

【0336】

「マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現カセット」についてのトランスジェニックマウスを、以下のようなP C R で同定した：

テンプレート：耳パンチDNA

順方向プライマー：

【0337】

【化1】

5'-CCAGTGTGATATGTGCCGTTTC-3' (配列番号24)；

逆方向プライマー：

【0338】

【化2】

5'-GAAGAGCGCAGAGCTCGGTA-3' (配列番号25)；

各プライマーの最終濃度：1.0 μM

PCRキット：Ready-to-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)

最終反応容量：25 μl；

サイクル条件：94 で60秒、次いで94 (10秒)、60 (20秒)、72 (40秒)の35サイクル、次いで、この35サイクルの最後での72で7分間のインキュベーション。

【0339】

このPCRのための順方向プライマー

【0340】

【化3】

【5'-CCAGTGTGATATGTGCCGTTTC-3' (配列番号24)】

は、3番目の 2コードエクソン (このエクソンは、終止コドンを含む) に位置する。

【0341】

このPCRのための逆方向プライマー

【0342】

【化4】

【5'-GAAGAGCGCAGAGCTCGGTA-3' (配列番号25)】

は、SV40ポリAシグナル/ターミネーター領域に位置する。

【0343】

PCR産物の電気泳動に際して、0.31 kbのバンドの存在は、この特定のマウスが、「マウスゲノム 2ヒトapoE発現カセット」についてのトランスジェニックであることを示した。これらのマウスの番号は、25、45、53、76、94、95および113であった。

【0344】

「マウスゲノム 10ヒトapoE発現カセット」についてのトランスジェニックマウスを、以下のようなPCRで同定した：

テンプレート：耳パンチDNA

順方向プライマー：

【0345】

【化5】

5'-TGGAGTCGATCCTTTCTACACCTA-3' (配列番号26)；

逆方向プライマー：

【0346】

【化6】

5'-AGAGCGCAGAGCTCGGTAC-3' (配列番号27)；

各プライマーの最終濃度：1.0 μM

PCRキット：Ready-to-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)

最終反応容量：25 μl；

サイクル条件：94 で60秒、次いで94 (10秒)、60 (20秒)、72 (40秒)の35サイクル、次いで、この35サイクルの最後での72で7分間のインキュベーション。

【0347】

このPCRのための順方向のプライマー

【0348】

【化7】

[5'-TGGAGTCGATCCTTTCTACACCTA-3' (配列番号26)]

は、2番目の10コードエキソン(このエキソンは、終止コドンを含む)に位置する。

【0349】

このPCRのための逆方向のプライマー

【0350】

【化8】

[5'-AGAGCGCAGAGCTCGGTAC-3' (配列番号27)]

は、SV40ポリAシグナル/ターミネーター領域に位置する。

【0351】

このPCR産物の電気泳動に際して、0.37kbのバンドの存在は、この特定のマウスが、「マウスゲノム10ヒトapoE発現カセット」についてのトランスジェニックであることを示した。これらのマウスの番号は、25、31、45、53、76、94、95および113であった。「マウスゲノム10ヒトapoE発現カセット」についてPCRによって陽性であったマウス#31が、「マウスゲノム2ヒトapoE発現カセット」についてはPCRによって陰性であったことに注目されたい。

【0352】

マウス#76および#113は、PCR遺伝型特定後直ぐに死亡した。残り6匹のトランスジェニック[#25(雌性)、#31(雄性)、#45(雌性)、#53(雄性)、#94(雄性)および#95(雄性)]ならびに5匹の非トランスジェニックコントロールマウス[#17(雄性)、#18(雌性)、#19(雌性)、#20(雄性)および#21(雄性)]を、続く表現型分析のために7週齢で剖検した。全てのマウスに、50mg/kgのBrdUを注射し、その1時間後に収集、ラジオグラフィー、および屠殺した。剖検に際して、異常に大きい甲状腺が、いくつかのトランスジェニックマウスにおいて見出された。剖検

の一部として、マウスを計量し、血液学および血清化学のために採血し、そして肝臓、脾臓、腎臓、心臓および胸腺を計量した。肝臓、胆嚢、脾臓、肺、脳、下垂体、心臓、腎臓、副腎、胸腺、胃、小腸、膵臓、盲腸、結腸、腸間膜リンパ節、皮膚、乳腺、気管、食道、甲状腺、上皮小体、唾液腺、膀胱、卵巣または精巣、子宮または前立腺および精嚢、骨ならびに骨髄を、組織学的分析のために収集した。

【0353】

ノーザンブロット分析を使用して、下記のように、全てのトランスジェニックマウスおよび非トランスジェニックコントロールマウスの肝臓における 2 mRNAおよび 10 mRNAのレベルを決定した。

【0354】

総RNAを肝臓サンプルから単離して定量し、各マウスについての総RNA 10 μ gをホルムアルデヒド変性アガロースゲルで電気泳動し、そしてナイロン膜に転写させた。これを、探索のための2つのノーザンブロットを作製するために、二重で行った。このアガロースゲルのエチジウムブロマイド染色は、全てのウェルにわたる、そして両方のゲル間での、実質的に等価なRNAのローディングを明らかにした。2の発現を評価するために、2 cDNAの全コード領域(ATG~TAG)を含む、ランダムプライムしたP32標識プローブで、1つのノーザンブロットを探索した。10の発現を評価するために、10 cDNAの全コード領域(ATG~TAG)を含む、ランダムプライムしたP32標識プローブで、第二のノーザンブロットを探索した。

【0355】

ハイブリダイゼーションを、「ExpressHyb Hybridization Solution」(Clontech, Palo Alto, CA)中で、65 で1時間行った。ブロットを、室温で、2×SSC、0.1%SDS中で、各回20分間、2回洗浄した。次いで、このブロットを、0.1×SSC、0.1%SDS中で、50 で10分間洗浄し、次いで、フィルムに曝露させた。

【0356】

ノーザン分析の結果は、以下の通りであった：

非トランスジェニックコントロールマウスについては、 2 または 10 のいずれについてもシグナルを見出さなかった。

トランスジェニックマウス # 9 4 (雄性) については、 2 または 10 のいずれについてもシグナルを見出さなかった。

トランスジェニックマウス # 2 5 (雌性) および # 4 5 (雌性) については、 2 および 10 の両方について、強力なシグナルを見出した。

トランスジェニックマウス # 9 5 (雄性) については、 2 および 10 の両方について、中程度のシグナルを見出した。

トランスジェニックマウス # 5 3 (雄性) については、 2 について中程度のシグナルを、そして 10 について弱いシグナルを見出した。

トランスジェニックマウス # 3 1 (雄性) については、 10 については中程度のシグナルが見出されたが、 2 についてはシグナルが見出されず、これは、マウス # 3 1 が、 10 のみを過剰発現し、 2 を発現しなかったことを示す。マウス # 3 1 における 10 発現レベルは、マウス # 5 3 において見出されたレベルよりも有意に大きかった。トランスジェニックマウス # 3 1 についての発現結果は、上記の P C R 遺伝子型特定 (# 3 1 について、「マウスゲノム 10 ヒト a p o E 発現カセット」に関しては陽性であったが、「マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現カセット」に関しては陰性であった) と一致する。マウス # 3 1 についてのデータは、「マウスゲノム 10 マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現ベクター導入遺伝子」DNAの「マウスゲノム 2 ヒト a p o E 発現カセット」領域が、マイクロインジェクションプロセスの間のいくつかの時点で短縮されて、10 を過剰発現するが 2 は発現しないマウスを生じたことを示す。トランスジェニックマウスを作製するプロセスの間の、導入遺伝子 D N A の剪断 / 短縮は、トランスジェニックに関する文献において以前に報告されている。

【 0 3 5 7 】

4 匹の 2 / 10 過剰発現体 (# 2 5、 # 4 5、 # 5 3 および # 9 5)、5 匹の非トランスジェニックコントロールマウス (# 1 7、 # 1 8、 # 1 9、 # 2 0 および # 2 1) およびトランスジェニックマウス # 3 1 (これは、 10 のみ

を過剰発現したが 2 を発現しなかった) 由来の肝臓、胆嚢、脾臓、肺、脳、下垂体、心臓、腎臓、副腎、胸腺、胃、小腸、膵臓、盲腸、結腸、腸間膜リンパ節、皮膚、乳腺、気管、食道、甲状腺、上皮小体、唾液腺、膀胱、卵巣または精巣、子宮または前立腺および精嚢、骨ならびに骨髄のH & EおよびBrdU染色切片を試験した。

【0358】

BrdUでの免疫組織学的染色を、自動化DPC Mark 5 Histochemical Staining System (Diagnostic Products Corp, Randolph, NJ) を使用して、4 μ mの厚さのパラフィン包埋切片上で行った。脱パラフィン化した組織切片を、0.1%のプロテアーゼで消化し、次いで、2Nの塩酸で処理した。切片を、CAS BLOCK (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) でブロッキングし、ラット抗BrdUモノクローナル抗体 (Accurate Chemical and Scientific, Westbury, NY) と共にインキュベートした。この一次抗体を、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンポリクローナル抗体 (Dako, Carpinteria, CA) で検出した。次いで、切片を、3%の過酸化水素でクエンチしてアビジン-ビオチン三次複合体 (Vector Laboratories) と反応させた。この染色反応を、ジアミノベンジジン (DAB, Dako Carpinteria, CA) で可視化して、切片を、ヘマトキシリンで対比染色した。

【0359】

4匹全ての 2 / 10 過剰発現体は、肝腫 (非トランスジェニックコントロールマウスにおける $4.98 \pm 0.29\%$ BW に対して $6.75 \pm 0.68\%$ BW、 $p = 0.0011$) および腎肥大 (非トランスジェニックコントロールマウスにおける $1.75 \pm 0.12\%$ BW に対して $2.23 \pm 0.21\%$ BW、 $p = 0.0033$) を示した。 2 / 10 過剰発現体マウスはまた、非トランスジェニックコントロールの対応マウスよりも僅かに低い平均体重を有した; この差異は、統計的に有意ではなかった。 2 / 10 過剰発現体マウス # 45 および # 53 はまた、中程度の巨脾腫を示した。 10 のみを過剰発現したが 2 を発

現しなかったトランスジェニックマウス#31は、正常な肝臓、腎臓および脾臓重量を有した。

【0360】

4匹全ての 2 / 10 過剰発現体マウスは、上昇した血清T4レベル(非トランスジェニックコントロールマウスにおける $5.0 \pm 0.7 \mu\text{g/dl}$ に対して $23.1 \pm 5.4 \mu\text{g/dl}$ 、 $p = 0.0001$)を有し、そしてトランスジェニックマウス#25および#45は、中程度の循環リンパ球増加症を有した。

10のみを過剰発現したが 2を発現しなかったトランスジェニックマウス#31は、正常な血清T4レベルおよびリンパ球数を有した。各々のマウスについての個々の血清T4値は、以下の通りであった：#17 ($5.0 \mu\text{g/dl}$)、#18 ($4.8 \mu\text{g/dl}$)、#19 ($6.3 \mu\text{g/dl}$)、#20 ($4.4 \mu\text{g/dl}$)、#21 ($4.7 \mu\text{g/dl}$)、#25 ($28.5 \mu\text{g/dl}$)、#45 ($26.9 \mu\text{g/dl}$)、#53 ($18.2 \mu\text{g/dl}$)、#95 ($18.7 \mu\text{g/dl}$)、および#31 ($3.2 \mu\text{g/dl}$)。

【0361】

4匹の 2 / 10 過剰発現マウス、5匹の非トランスジェニックコントロールマウス、およびマウス#31(10のみを過剰発現したが 2を発現しなかった)由来の肝臓、胆嚢、脾臓、肺、脳、下垂体、心臓、腎臓、副腎、胸腺、胃、小腸、膵臓、盲腸、結腸、腸間膜リンパ節、皮膚、乳腺、気管、食道、甲状腺、上皮小体、唾液腺、膀胱、卵巣または精巣、子宮または前立腺および精嚢、骨ならびに骨髄のH&EおよびBrdU染色切片を試験した。組織学的には、4匹全ての 2 / 10 過剰発現体マウスは、多発性小胞状乳頭状腺腫を含む二側方に増大した甲状腺を示した。4匹全ての 2 / 10 過剰発現体マウスはまた、非トランスジェニックマウスに対して、肝細胞BrdU標識の増大と共に、弱～中程度の肝細胞過形成を示した。トランスジェニックマウス#31は、これらの特徴のいずれも有さなかった。

【0362】

まとめると、4匹の 2 / 10 過剰発現体トランスジェニックマウスは、上昇した血清T4レベルによって示されるような、多発性小胞状乳頭状腺腫を有す

る二側方の甲状腺の増大、および生じる甲状腺機能亢進症によって特徴付けられる表現型を示した。他の表現型の変化は、全身性の甲状腺機能亢進状態に関連するように思われ、これは中程度の肝腫、肝細胞過形成、および僅かに減少した血清コレステロールレベル、二側方の腎肥大、およびリンパ球の優勢を伴う弱～中程度の白血球増加症だ。

【0363】

マウス 2 を過剰発現するが 10 を発現しない上記のトランスジェニックマウス (#7、#8、#26、#28、#156 および #186) は、表現型を有さず、そして 10 を過剰発現するが 2 を発現しないトランスジェニックマウス #31 は、表現型を有さなかった。これは、4匹全ての 2 / 10 過剰発現体トランスジェニックマウス (#25、#45、#53 および #95) において見出された甲状腺機能亢進の表現型が、本発明において記載された 2 / 10 ヘテロ二量体ホルモンに起因し得ることを示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明に従うヒト 10 ポリペプチドの全長コード領域 (配列番号1) を線状アレイにて示す。推定シグナルペプチドに下線を付し、そしてその推定シグナルペプチド切断部位を含む領域を四角で囲む。古典的 N x T グリコシル化モチーフ中に位置しそして非常にグリコシル化される可能性が高い、アスパラギン (N) 残基が、より大きなフォントで示される。このポリペプチドをコードする対応する核酸配列 (配列番号2) は、この図に示される核酸配列のヌクレオチド1~390 (両端を含む) を含む。

【図2】

図2A~2Dは、既知のヒト糖タンパク質ホルモン サブユニットポリペプチド (先行技術) と本発明の 10 ポリペプチドとの関連を示す。これらの比較のために使用される 10 の成熟形態 (配列番号3) は、おそらく、真正なインビボ形態の 10 ポリペプチドを示す。図2A~Dは、成熟形態の 10 と、それぞれ、TSH - (甲状腺刺激ホルモン) - サブユニット、FSH - (卵胞刺激ホルモン) - サブユニット、LH - (黄体形成ホルモン) - サブユニット、

およびCG - (絨毛性性腺刺激ホルモン) - サブユニットとの、アミノ酸相同性を示すGAP出力を含む。

【図3】

図3は、おそらく成熟形態のヒト10(配列番号3)における5つの推定ジスルフィド結合の可能なジスルフィド結合システイン(C)対を示す。その10個のシステイン残基は、より大きなフォントで示され、そしてそのジスルフィド結合は、実線として描かれる。システイン-ノットを形成する3つのジスルフィド結合(C12 - C60、C36 - C91、C40 - C93)が、アミノ酸配列の上に描かれ、そしてその2つのさらなるジスルフィド結合(C26 - C75、C96 - C103)が、そのアミノ酸配列の下に描かれる。

【図4】

図4は、成熟形態のヒト10と成熟形態のマウス10との間のアミノ酸相同性を示す、Bestfit出力である。この比較のために使用される成熟形態のヒト10(配列番号3)は、おそらく、真性なインビボ形態のヒト10ポリペプチドを示す。この比較のために使用される成熟形態のマウス10(配列番号13)は、おそらく、真性なインビボ形態のマウス10ポリペプチドを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Amgen Inc.

<120> Beta-Like Glycoprotein Hormone Polypeptide and Heterdimer

<130> A-676B

<140> Not Assigned Yet

<141> 2001-03-27

<150> 09/723,970

<151> 2000-11-27

<150> 60/199,211

<151> 2000-04-24

<150> 60/192,654

<151> 2000-03-28

<160> 28

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Leu Ala Phe Leu Phe Leu Gly Pro Met Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Gly Tyr Gly Cys Val Leu Gly Ala Ser Ser Gly Asn Leu Arg Thr
 20 25 30
 Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu Phe Thr Phe Leu Ala Lys Lys Pro
 35 40 45
 Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys
 50 55 60
 Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala His
 65 70 75 80
 His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu Thr Lys Gln Val Thr Val Lys Leu
 85 90 95
 Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Val Ala
 100 105 110
 Ile Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu
 115 120 125
 Thr Ile
 130

<210> 2

<211> 390

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaagctgg cattctcttt ccttggcccc atggccctcc tccttctggc tggctatggc 60
 tgtgtcctcg gtgcctccag tgggaacctg cgcacctttg tgggctgtgc cgtgagggag 120
 tttactttcc tggccaagaa gccaggctgc aggggcttc ggatcaccac ggatgcctgc 180
 tggggtcgct gtgagacctg ggagaaacct attctggaac cccctatat tgaagcccat 240
 catcgagtct gtacctacaa cgagaccaa caggtgactg tcaagctgcc caactgtgcc 300
 ccgggagtcg accccttcta cacctatccc gtggccatcc gctgtgactg cggagcctgc 360
 tccactgcca ccacggagtg tgagaccatc 390

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Ser Gly Asn Leu Arg Thr Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Leu Ala Lys Lys Pro Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr
 20 25 30
 Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu
 35 40 45
 Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala His His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu
 50 55 60
 Thr Lys Gln Val Thr Val Lys Leu Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp
 65 70 75 80
 Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Ile Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys
 85 90 95
 Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu Thr Ile
 100 105

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgaagctgg cattcctctt cctt

24

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gcatgtgctg ctcacacagg t

21

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ctgcaggtgc cttcggatc

19

<210> 7

<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gagacatctc cccactgtgt tt 22

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
gtttccccca acagaatgtc aa 22

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
atgcctatgg cgtcccctca aac 23

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
ctagtagcga gagaggcgac acatgtca 28

<210> 11
<211> 130
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

Met Lys Leu Val Tyr Leu Val Leu Gly Ala Val Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Pro Asp Ser Val Leu Ser Ser Ser Ser Gly Asn Leu His Thr
 20 25 30
 Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu Phe Thr Phe Met Ala Lys Lys Pro
 35 40 45
 Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys
 50 55 60
 Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala Tyr
 65 70 75 80
 His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu Thr Arg Gln Val Thr Val Lys Leu
 85 90 95
 Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Met Ala
 100 105 110
 Val Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu
 115 120 125
 Thr Ile
 130

<210> 12

<211> 393

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

atgaagttgg tataccttgt ccttggtgca gtggccctcc ttctcctggg tggccctgac 60
 tctgtcctca gcagctccag tgggaacctg cacacttttg tgggtgtgac tgtgagggaa 120
 ttcactttca tggccaagaa gccaggctgc aggggacttc ggatcaccac agatgcctgc 180
 tggggccgct gcgagacctg ggagaaadcc atcctggagc ctcctacat tgaagcctat 240
 catcgagtgt gtacatacaa tgagaccaga caggtgacag tgaagctgcc taactgtgcc 300
 cctggagtgc atcctttcta cacctacct atggctgtcc gatgtgactg tggggcgtgt 360
 tccactgcca ccactgagtg tgagaccatc tga 393

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Ser Ser Ser Gly Asn Leu His Thr Phe Val Gly Cys Ala Val Arg Glu
 1 5 10 15
 Phe Thr Phe Met Ala Lys Lys Pro Gly Cys Arg Gly Leu Arg Ile Thr
 20 25 30
 Thr Asp Ala Cys Trp Gly Arg Cys Glu Thr Trp Glu Lys Pro Ile Leu
 35 40 45
 Glu Pro Pro Tyr Ile Glu Ala Tyr His Arg Val Cys Thr Tyr Asn Glu
 50 55 60
 Thr Arg Gln Val Thr Val Lys Leu Pro Asn Cys Ala Pro Gly Val Asp
 65 70 75 80
 Pro Phe Tyr Thr Tyr Pro Met Ala Val Arg Cys Asp Cys Gly Ala Cys
 85 90 95
 Ser Thr Ala Thr Thr Glu Cys Glu Thr Ile
 100 105

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 14

attactagtt ccaccatgaa gttggtatac cttgtcctt

39

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 15

ttaataatcg atcgtcagat ggtctcacac tcagtg

36

<210> 16

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

 <220>
 <223> Oligonucleotide
 <400> 16
 ccgcactagt tccacatgc ccatggcacc acgagt 36

 <210> 17
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotide
 <400> 17
 gcggcggttcg atcgctagta gcgggagaaa cggcacatat c 41

 <210> 18
 <211> 815
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <400> 18
 atgcccattgg caccacgagt cttgctcctt tgccctgctgg gcctggcagt cactgaaggg 60
 catagcccag agacagccat cccaggctgc cacttgcacc gtgagtaact ctgcttgggg 120
 agcgggatgga cgggtaaccc ggccagcacg gccttcaccg gctgctccct tctctgcttc 180
 cagccttcaa tgtgacggtg cgcagtgatc gcctcggcac ttgccagggc tcccacgtgg 240
 cacaggcctg tgtaggacac tgtgagtcta gtgctttccc ttcccgtac tctgtgctgg 300
 tggccagtgg ctatcggcac aacatcacct cttoctccca gtgctgcacc atcagcagcc 360
 tcagaaaggt aaggggcctg agcctgatgg agcgtgaggg tggggacceca ggggcctgag 420
 cctgatggag cgtgaggggtg gggaccagg ggtccgaacc tgacctggtg tgaggggtggg 480
 gaccacaggag cccgaacctg accaggtatg aggggtgggga cccaggggcc cgaacctgac 540
 cggggtgtaa ggggtggggtc ccccaggggc ccgaacctga ccggggccata aggggtgggga 600

cccccagggg cccgaacctg accaggtgtg agggtagagga cccaggggtt cgaacctgat 660
 gggggcgtga gggtaggggtg gaatgggaac aaacttgggt cctcctccaa caggtgaggg 720
 tgtggctgca gtgcgtgggg aaccagcgtg gggagcttga gatctttact gcaagggcct 780
 gccagtgtga tatgtgccgt ttctcccgt actag 815

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19
 gcctctagaa agagctggga c 21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20
 cgccgtgttc catttatgag c 21

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 21
 attactagtt ccacatgaa gttggtatac cttgtcctt 39

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 22

ttaataatcg atcgtcagat ggtctcacac tcagtg

36

<210> 23

<211> 2985

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 23

atgaagttgg tataccttgt ccttgggtgca gtggccctcc ttctcctggg tggccctgac	60
tctgtcctca gcagctccag tgggaacctg cacacttttg tgggetgtgc tgtgagggaa	120
ttcactttca tggccaagaa gccaggctgc aggggacttc ggatcaccac agatgcctgc	180
tggggccgct gcgagacctg ggaggtgagt agtccaaggg gcttgggtgg cagtgtcctc	240
ggggacaggg ccttgatttc aagctcacag tttcacgatg gaggggaagc tggcatacct	300
gcctgcccct ctgggctcta aaaagctgat cacacaatta tttggcttct tccatatggg	360
ctgaaaacca tgatgatggg tttttccaga ggactgttga ggttgtaat gtaattcca	420
tggttctgtt tgggagccat ccctaggagg gtgggtgcta ctatttacc	480
tcacaggaaa ggagtcgaga gggaatggct tcgaagtcag agagagtcag tgcaagttg	540
gaaatgaatt cttgggtccaa acctgtgacc acatctcctt cctgtathtt ctcagctgtg	600
aggaagtcag gcagttacc	660
agaagaacct ggaagctgca tgctgagaga ggcgtagtcc	660
caggctctgc cactgactgtt ttccctttgt cccagctccag tgtgagatct ggtctgtccc	720
tttataccca gttctgtctg gactttcatt tttagagtgg gtgcatacat ctcaaagctg	780
gcttaactag aaagtgttcg tgggtgtccag ctgagctgac tcttgctgaa aatggtgacg	840
tctcagtgac ctgagcttca aagatggcag atttagcaaa attaaagcca aaagaacctc	900
cccacaccga aatcaaccaa ccaactcaaa acaccattaa cccccttcca cctcagacct	960
tcccacaat ctgaagtga gtgaaattaa aaaaaaaaaa gttaggggac tcagataaat	1020
ttgaattcag atcaataaca caatttttt ggccctaagcc caccccaaat attgcatgag	1080
acagatttat aaaataaaaa aattgaaata caaagttaat tgagtacgca atttttctag	1140
aatcccagaa tgctgagagt cagaagacag aatggagaga gaaacggaac ttctcctccc	1200
ggcccttgag aaggacaggt ctctgtttt ataatatga agctggattt catcttgagc	1260
tggcttgccct gtcactata ggtgtacaca cacacacatg tgtatgtgtg tgtgcctatg	1320

cacatatgta cttatgtatg tatatatgta tatctcttga ttctatgtac ctgcgtgcat	1380
tatctatata cgtgtatgcc tgtgcataca tctaagcacg tagctatgta tagatgtatg	1440
tatcatctat ctgatttccc tacttaacat tattattatt ttttggattg gaacaaaggg	1500
actgttcocct gaatgattat tgttattgat tctgttactac atccttatac ttgcgctcat	1560
aagagccatt gactacttgt attgagccct gacctttcgc cagggcttgt gcaactgcaca	1620
catcacctca tctagctcca tgacaatgct agcaaagggt tttttttttt ttatttcctt	1680
atagaagagg gaacaagggc ttggaagagt taagagcttc ccctaggtct ccagcagcag	1740
taaagcaggg aggcatagtg gggctgactg cagactctgg gtctctctct actgatctct	1800
acgttctcta acagaatcat ctttgaagtc aaggtttata aaaggcaaag ggaggaagtg	1860
aactaacctt ccagtcatta ggcagaata ttcaggaagc tccctggccc tgctgtcttt	1920
tgtggattca gttacaagta gttcttgcag aagtctggg taccaggctg gctgggtact	1980
ggagaatagt ggctgacctt acggagctcg gtctccacat taggagcaat gtcacacaaa	2040
gatacaggag atggcatgtg gaaatggaga aacacagcaa accagcccct aaaccagaac	2100
cacacaggaa gggactaggg agcgcaggg cttggagggt gggtgaagcg atttaaaata	2160
gcatcagaaa atgccgctct ggattgggtg agatttgaac agaatcctaa gagcttggtg	2220
ataggtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgggtgtct	2280
gggcagaggg aacagcagat acaaagacc tcagtttggg ttctgaagca gcatagagac	2340
cactgtgact ggagctggag accgtgttgg caaggtcagg gccatagctg acatgtcaga	2400
agtaagagta cgggcagaaa atacagggac ttgagaagaa tccatagctc tgtgtttacc	2460
ctgagggaga tggaaaacta cgggggtttg agcagcgggt agccaggact gacttgtatt	2520
ttaaaaggct cattcgtgct gtaaacattt tgtaggggta atggtagggag aagggagacc	2580
agcatttact aaatatttac caagtgcac cgtgttctg tgggctttcg tggagctcg	2640
ggacatggta atgagcaaag taacttcctg ctttcaggag tgtattcgtg gtgggaggag	2700
tcagtaogta agtaaccagc cagtgatgac tggcaccaag aacaggaagc ggatgctgta	2760
ttctaacatt tttcctgttt tttaaccttg ggatagaaac ccatcctgga gcctccctac	2820
attgaagcct atcatcgagt gtgtacatac aatgagacca gacaggtgac agtgaagctg	2880
cctaactgtg cccctggagt cgtcctttc tacacctacc ctatggctgt ccgatgtgac	2940
tgtggggcgt gttccactgc caccactgag tgtgagacca totga	2985

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24
ccagtgtgat atgtgccgtt tc

22

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Simian virus 40

<400> 25
gaagagcgca gagctcggta

20

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 26
tggagtcgat cctttctaca ccta

24

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> Simian virus 40

<400> 27
agagcgcaga gctcggtag

19

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Oligopeptide

<400> 28

Cys Ser Pro Arg Tyr Ser Val Leu Val Ala Ser Gly Tyr Arg His Asn
1 5 10 15

【図1】

Fig. 1

ヒト乳糖アザラジ糖ホリエンβ10ポリペプチド:

MKLAFLGPMALLLAGYGCVLGASSGNLRFVGCAREFTFLAKKPGCGRLRITFDACNGRCETWEKFILEPPYIEAHRVCTYNETKQVTVKLENCARQVDFVYYPVAIRCDGAGACSTATTECETI

ヒト乳糖アザラジ糖ホリエンβ10ポリペプチドの塩基配列:

ATGAAGCTGGCAATTCCTCTCCTGGCCCAATGGCCCTCCCTTCTGGC
TGGCTATGGCTGTGTCTCGGTGCCCTCCAGTGGGAACCTGCCACCTTTG
TGGCTGTGCCGTGAGGAGTTTACTTTTCTGGCCAAGAAGCCAGGCTGC
AGGGCCCTTCGGATCACACGGATGCTGCTGGGTCCGTGTGAGACCTG
GGAGAAACCCATTCGGAAACCCCTATAATTGAAGCCCATCATCGAGTCT
GTACCTACAAACGAGACCAACAGGTGACTGTCAAGCTGCCCAACTGTGCC
CCGGGAGTCGACCCCTTCTACACCTATCCCGTGGCCATCCGCTGTGACTG
CGGAGCCTGCTCCACTGCCACCCAGGAGTGTGAGACCATCTGAGGCCGCT
AGCTGCTCTCTGCAGACCCACCTGTGTGAGCAGCACATGC

【図2B】

Fig. 2B

GAP OF: HUMAN FSH-β CHECK: 8841 FROM: 1 TO: 111

TO: HUMAN β10 CHECK: 6611 FROM: 1 TO: 106

SYMBOL COMPARISON TABLE:
/GCGDISK/GCG10/GCGCORE/DATA/RUNDATA/BLOSUM62.CMP
COMPCHECK: 6430

GAP WEIGHT: 8 AVERAGE MATCH: 2.912
LENGTH WEIGHT: 2 AVERAGE MISMATCH: -2.003

QUALITY: 156 LENGTH: 122
RATIO: 1.472 GAPS: 3
PERCENT SIMILARITY: 44.211 PERCENT IDENTITY: 35.789

MATCH DISPLAY THRESHOLDS FOR THE ALIGNMENT(S):
| = IDENTITY
: = 2
. = 1

HUMAN FSH-β X HUMAN β10

```

1 .....NSCELTNITIAIEKEEFCISINTTWCAGYCYTRDL.VYK 40
      | . | . | | : | | | | | : : .
1 ASSGNLRTFVGCAREFTFLAKKPGCR.GLRITTDACWGRCEWTKPILE 49

41 DPARPKIQTCTFKELVYETVRVPGCAHADSPLYTYPVATQCHCGKCDSD 90
      | : ||: | ||:-| || | ||||| .| || | .
50 PPYIEAHRVCTYNETKQVTVKLPNCAPGVDPFYTYPVAIRCDCGACSTA 99

91 STDC.TVRGLGPSYCSFGEMKE 111
      .|:| |:
100 TTECETI..... 106

```

【図2C】

Fig. 2C

GAP OF: HUMAN LH- β CHECK: 5679 FROM: 1 TO: 121
 TO: HUMAN β 10 CHECK: 6611 FROM: 1 TO: 106

SYMBOL COMPARISON TABLE:
 /GCGDISK/GCG10/GCGCORE/DATA/RUNDATA/BLOSUM62.CMP
 COMPCHECK: 6430

GAP WEIGHT:	8	AVERAGE MATCH:	2.912
LENGTH WEIGHT:	2	AVERAGE MISMATCH:	-2.003
QUALITY:	140	LENGTH:	125
RATIO:	1.321	GAPS:	3
PERCENT SIMILARITY:	44.118	PERCENT IDENTITY:	32.353

MATCH DISPLAY THRESHOLDS FOR THE ALIGNMENT(S):

| = IDENTITY
 : = 2
 . = 1

HUMAN LH- β X HUMAN β 10

```

1 .SREPLRPW..CHPINAILAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMMR.VLQ 46
  |  || . | . | | : : | | | | : : |
1 ASSGNLRTFVGC VREFTFLAKKPGCR.GLRITTDACWGRCETWEKPILE 49

47 AVLPPLPQVVCTYRDVRFESIRLPGCPRGVDPVVSFPVALSCRCGPCRRS 96
  |||| : : . : | | ||| . : ||| : | | | .
50 PPYIEAHRVCTYNETKQVTVKLPNCAPGVDPFYTYPVVAIRCDCGACSTA 99

97 TSDCGGPKDHPLTCDHPQLSGLLFL 121
  | . : |
100 TTECETI..... 106

```

【図 2D】

Fig. 2D

GAP OF: HUMAN CG-β CHECK: 2358 FROM: 1 TO: 145
 TO: HUMAN β10 CHECK: 6611 FROM: 1 TO: 106

SYMBOL COMPARISON TABLE:
 /GCGDISK/GCG10/GCGCORE/DATA/RUNDATA/BLOSUM62.CMP
 COMPCHECK: 6430

GAP WEIGHT:	8	AVERAGE MATCH:	2.912
LENGTH WEIGHT:	2	AVERAGE MISMATCH:	-2.003
QUALITY:	131	LENGTH:	149
RATIO:	1.236	GAPS:	3
PERCENT SIMILARITY:	42.157	PERCENT IDENTITY:	31.373

MATCH DISPLAY THRESHOLDS FOR THE ALIGNMENT(S):
 | = IDENTITY
 : = 2
 . = 1

HUMAN CG-β X HUMAN β10

```

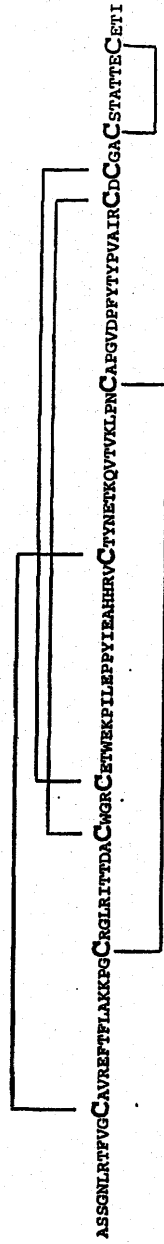
1 .SKEPLRP..RCRPINATLAVEKEGCPVCITVNTTICAGYCPTMTR.VLQ 46
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
1 .ASSGNLRTFVGCAREFTFLAKKPGCR.GLRI'TTDACWGRCEWTEKPILE 49

47 GVLPALPQVVCNYRDVRFESIRLPGCPRGVNPFVVSYAVALSCQCALCRRS 96
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
50 PPYIEAHHRVCTYNETKQVTVKLPNCAPGVDPFYTYFPVAIRCDCGACSTA 99

97 TTDCGGPKDHPLTCDDPRFQDSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ 145
  |  |  |
100 TTECETI..... 106
  
```

【図3】

Fig. 3



εβ10

— = シタル7ド結合

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 01/09999
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/16 C07K14/575 C07K14/59 C12N5/10 C12N1/21 C07K16/26 G01N33/68 A61K39/395 A61K38/22 A61K31/7088 C12N15/62 A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N A61K A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, EMBL, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 41377 A (ZYMOGENETICS INC) 19 August 1999 (1999-08-19) cited in the application the whole document ---	1-99
A	SUN ET AL: "the cysteine-knot growth factor superfamily" ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIOMOLECULAR STRUCTURE, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 24, 1995, pages 269-292, XP002104603 ISSN: 1056-8700 --- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 29 January 2002		Date of mailing of the international search report 13/02/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Cornec, N

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/09999

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBL 'Online! CNS0000U, accession number AL049871, 15 May 1999 (1999-05-15) GENOSCOPE: "Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-696D21 of library RPCI-11 from chromosome 14 of Homo sapiens" XP002188625 cited in the application abstract & R. HEILIG ET AL: "sequencing of human chromosome 14" UNPUBLISHED,</p>	1-3,11
A	<p>--- DATABASE EMBL 'Online! CNS01DRS, accession number AL118555, 24 September 1999 (1999-09-24) GENOSCOPE: "Human chromosome 14 DNA sequence BAC C-2011M8 of library CalTech-D from chromosome 14 of Homo sapiens" XP002188626 abstract & R. HEILIG ET AL: "Sequencing of human chromosome 14" UNPUBLISHED,</p>	1-3,11
A	<p>--- DATABASE EMBL 'Online! accession number A0495547, 29 April 1999 (1999-04-29) G.G. MAHEIRAS ET AL: "HS-5211-B1-H08-SP6E RPCI-11 human male BAC library Homo sapiens genomic clone plate=787 col=15 Row=P, genomic survey sequence" XP002188627 abstract & G.G. MAHERAS ET AL: "Sequence-tagged connectors: a sequence approach to mapping and scanning the human genome." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES , vol. 96, no. 17, 1999, pages 9739-9744,</p>	1-3,11
A	<p>US 5 712 122 A (BOIME IRVING ET AL) 27 January 1998 (1998-01-27)</p>	
P,A	<p>--- WO 00 78964 A (AMGEN INC) 28 December 2000 (2000-12-28) cited in the application claims</p>	

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 01/09999

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 53346 A (AKZO NOBEL NV ;MOSELMAN SIETSE (NL); SPEK VAN DER PETRUS JOHANNES) 26 July 2001 (2001-07-26) the whole document especially sequences ID no.1 and no.2 claims ---	1-99
E	WO 01 40291 A (BURGESS CATHERINE E ;PRAYAGA SUDHIRDAS K (US); MEZES PETER S (US);) 7 June 2001 (2001-06-07) the whole document especially claims; figures 6A,6B -----	1-99

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 37-38, 52, 57, 87, 88, 91 are directed to a method of treatment of the human/animal body (rule 39.1 IV PCT), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 53-54 and 96-97 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body (rule 39.1 IV PCT), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 23, 34, 37-39, 73, 84, 89 all partially

Claims 23, 34, 39 and 73, 84 refer to a selective binding agent that specifically binds to "beta10" polypeptide without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported.

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved. But a partial has been carried out as far as the selective binding agent is an antibody against "beta10" polypeptide as defined in claims 24-33 and in claims 74-83.

Claims 37 and 38 refer to a method of treatment using a selective binding agent without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported.

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved. But a partial has been carried out as far as the selective binding agent is an antibody against "beta10" polypeptide as defined in claims 24-33.

Claim 89 refers to a composition comprising selective binding agent without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claim is ambiguous and vague, and its subject-matter is not sufficiently disclosed and supported.

No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved. But a partial has been carried out as far as the selective binding agent is an antibody against "beta10" polypeptide.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/09999

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family members:	Publication date
WO 9941377	A	19-08-1999	AU 2676399	A 30-08-1999
			EP 1053324	A1 22-11-2000
			WO 9941377	A1 19-08-1999
US 5712122	A	27-01-1998	US 5585345	A 17-12-1996
			US 5338835	A 16-08-1994
			US 5177193	A 05-01-1993
			US 5705478	A 06-01-1998
			US 5792460	A 11-08-1998
			US 5405945	A 11-04-1995
			AT 148171	T 15-02-1997
			AU 648020	B2 14-04-1994
			AU 5332790	A 26-09-1990
			AU 697899	B2 22-10-1998
			AU 6581996	A 16-01-1997
			AU 670510	B2 18-07-1996
			AU 6747494	A 29-09-1994
			CA 2053864	A1 22-08-1990
			DE 69029799	D1 06-03-1997
			DE 69029799	T2 28-05-1997
			DK 461200	T3 10-03-1997
			EP 0461200	A1 18-12-1991
			ES 2098261	T3 01-05-1997
			JP 3045539	B2 29-05-2000
JP 4503606	T 02-07-1992			
WO 9009800	A1 07-09-1990			
US 6306654	B1 23-10-2001			
WO 0078964	A	28-12-2000	AU 5491900	A 09-01-2001
			WO 0078964	A1 28-12-2000
WO 0153346	A	26-07-2001	AU 3732001	A 31-07-2001
			WO 0153346	A1 26-07-2001
WO 0140291	A	07-06-2001	AU 1817201	A 12-06-2001
			WO 0140291	A2 07-06-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 1/04		A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 6
3/04		3/10	4 H 0 4 5
3/06		5/14	
3/10		9/10	1 0 1
5/14		9/12	
9/10	1 0 1	11/06	
9/12		15/00	
11/06		15/10	
15/00		15/12	
15/10		17/02	
15/12		17/06	
17/02		19/02	
17/06		21/00	
19/02		25/22	
21/00		29/00	
25/22		31/00	
29/00		31/18	
31/00		35/00	
31/18		37/02	
35/00		37/08	
37/02		43/00	1 1 1
37/08		C 0 7 K 14/575	
43/00	1 1 1	16/26	
C 0 7 K 14/575		19/00	
16/26		C 1 2 N 1/15	
19/00		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21		C 1 2 Q 1/02	
5/10		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/02		33/566	
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A
G 0 1 N 33/53		5/00	A
33/566		A 6 1 K 37/02	

(31)優先権主張番号 0 9 / 7 2 3 , 9 7 0

(32)優先日 平成12年11月27日(2000 . 11 . 27)

(33)優先権主張国 米国 (U S)

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

(72)発明者 カオ, ジン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91356,
タルザナ, エティワンダ アベニュー
5731 ナンバー5

(72)発明者 ダニレンコ, ディミトリー マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91361,
サウザンド オークス, ローリング
オークス ドライブ 750

(72)発明者 ゴング, ジャンファ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91362,
サウザンド オークス, ガーリング
サークル 2489

(72)発明者 ヒル, デイビッド シー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91360,
サウザンド オークス, カレ カスタ
ノ 998

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA01 CA01 DA02
DA05 DA06 DA11 DA12 DA20
HA20
4B063 QA00 QA19 QQ02 QQ79 QQ94
QR48 QS33 QX01
4B064 AG15 CA19 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA93Y AB01 AB04 AC14
BA02 BA08 CA25 CA26 CA44
CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01
BA21 BA23 CA53 DB72 NA14
ZA052 ZA072 ZA422 ZA452
ZA592 ZA662 ZA692 ZA702
ZA812 ZA892 ZA942 ZA962
ZB072 ZB112 ZB132 ZB262
ZB332 ZB352 ZC062 ZC332
ZC352 ZC542 ZC552
4C086 AA01 AA03 AA04 EA16 MA01
MA04 NA14 ZA05 ZA07 ZA42
ZA45 ZA59 ZA66 ZA69 ZA70
ZA81 ZA89 ZA94 ZA96 ZB07
ZB11 ZB13 ZB26 ZB33 ZB35
ZC06 ZC33 ZC35 ZC55
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 BA53
CA40 DA30 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	β样糖蛋白激素的多肽和异二聚体		
公开(公告)号	JP2003528611A	公开(公告)日	2003-09-30
申请号	JP2001570751	申请日	2001-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	パスティー・クリストファー・ジェイ・アール カオジン ダニレンコ・ディミトリー・マイケル ゴング・ジャンフア ヒル・デイビッド・シー		
发明人	パスティー, クリストファー・ジェイ・アール. カオ, ジン ダニレンコ, ディミトリー・マイケル ゴング, ジャンフア ヒル, デイビッド・シー.		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K35/12 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P15/00 A61P15/10 A61P15/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/22 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/575 C07K14/59 C07K16/26 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/16 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/74		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K35/12 A61K38/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/06 A61P15/00 A61P15/10 A61P15/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/22 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/575 C07K14/59 C07K16/26 C07K2317/34 G01N33/74 G01N2333/59		
FI分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K45/00 A61P1/04 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P11/06 A61P15/00 A61P15/10 A61P15/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/22 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K14/575 C07K16/26 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA01 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/DA20 4B024/HA20 4B063/QA00 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ79 4B063/QQ94 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG15 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA26 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DB72 4C084/NA14 4C084/ZA052 4C084/ZA072 4C084/ZA422 4C084/ZA452 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA692 4C084/ZA702 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC062 4C084/ZC332 4C084/ZC352 4C084/ZC542 4C084/ZC552 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA05 4C086/ZA07 4C086/ZA42 4C086/ZA45 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA69 4C086/ZA70 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZC06 4C086/ZC33 4C086/ZC35 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		

