

(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 - 529361

(P2003 - 529361A)

(43)公表日 平成15年10月7日(2003.10.7)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 35/76	2 G 0 4 5
		39/395	D 4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76			N 4 B 0 2 9
38/00		48/00	4 B 0 6 3
39/395		A 6 1 P 1/04	4 B 0 6 4
審査請求 未請求 予備審査請求 (全150数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 572592(P2001 - 572592)

(86)(22)出願日 平成13年3月29日(2001.3.29)

(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/US01/10048

(87)国際公開番号 W001/074903

(87)国際公開日 平成13年10月11日(2001.10.11)

(31)優先権主張番号 60/193,728

(32)優先日 平成12年3月30日(2000.3.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/723,258

(32)優先日 平成12年11月27日(2000.11.27)

(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 ウェルチャー, アンドリュウ エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 93001,
ベンチュラ, チャーチ ストリート 1
175

(72)発明者 カルゾーン, フランク ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91361,
ウエストレイク ビレッジ, パイン ク
レスト サークル 841

(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CD20 / I g E レセプター様分子およびその使用

(57)【要約】

本発明は、新規のCD20 / I g E レセプター様ポリペ
プチドおよびこれをコードする核酸分子を提供する。本
発明はまた、ベクター、宿主細胞、アゴニストおよびア
ンタゴニスト (選択的結合因子 (例えば、抗体) を含む
) ならびにCD20 / I g E レセプター様ポリペプチド
を産生するための方法を提供する。本発明はさらに、C
D20 / I g E レセプター様ポリペプチドに関連する疾
患を処置、診断、改善、および/または予防するための
方法もまた提供する。

【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1または配列番号3のいずれかに示すヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) 中程度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、コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドに少なくとも約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、該ポリペプチドが、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFitまたはSmith-Watermanアルゴリズムのようなコンピュータープログラムを使用して決定されるように、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1または配列番号3のいずれかに示す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、コードされるポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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1；配列番号3；(a)；または(b)のいずれかのヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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1もし

くは配列番号3、または(a)~(c)のいずれかのヌクレオチド配列；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で(a)~(d)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、ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(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2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮化および/またはN末端短縮化を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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末端短縮化およびN末端短縮化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2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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、ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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】 CD20/IgEレセプター様ポリペプチドを産生するプロセスであって、請求項5に記載の宿主細胞を、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で培養する工程、および必要に応じて、該ポリペプチドを該培養物から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産生される、ポリペプチド。

【請求項10】 前記核酸分子が、CD20/IgEレセプター様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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドについてのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、請求項8に記載のプロセス。

【請求項11】 前記パーセント同一性が、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使用して決定される、請求項2に記載の単離された核酸分子。

【請求項12】 化合物が、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド活性またはCD20/IgEレセプター様ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項5、6または7に記載の細胞を、該化合

物に曝露する工程、および該細胞中でのCD20/IgEレセプター様ポリペプチド活性またはCD20/IgEレセプター様ポリペプチド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2または配列番号4のいずれかに示す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2または配列番号4のいずれかのオルソログについてのアミノ酸配列であって、該コードされるポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70、80、85、90、95、96、97、98、または99パーセント同一のアミノ酸配列であって、ポリペプチドが、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFitまたはSmith-Watermanアルゴリズムのようなコンピュータープログラムを使用して決定されるように、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列のフラグメントであって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、フラグメント；

(d) 配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列または(a)～(b)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、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮化および/またはN末端短縮化を有する配列番号2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮化およびN末端短縮化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2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すポリペプチドの活性を有する、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16】 請求項1、2、または3の核酸分子によってコードされる、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、パーセント同一性が、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使用して決定される、単離されたポリペプチド。

【請求項18】 配列番号2または配列番号4の86位のアミノ酸が、グリシン、プロリン、またはアラニンである、請求項14、15または16に記載のポリペプチド。

【請求項19】 配列番号2または配列番号4の95位のアミノ酸が、ロイシン、バリン、イソロイシン、アラニン、チロシンまたはフェニルアラニンである、請求項14、15または16に記載のポリペプチド。

【請求項20】 配列番号2または配列番号4の103位のアミノ酸が、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、フェニルアラニンまたはノルロイシンである、請求項14、15または16に記載のポリペプチド。

【請求項21】 配列番号2または配列番号4の121位のアミノ酸が、アスパラギンまたはグルタミンである、請求項14、15または16に記載のポリペプチド。

【請求項22】 配列番号2または配列番号4の128位のアミノ酸が、アラニン、バリン、ロイシンまたはイソロイシンである、請求項14、15または16に記載のポリペプチド。

【請求項23】 配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドで動物を免疫することによって産生される、抗体。

【請求項24】 請求項13、14または15に記載のポリペプチドを特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項25】 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26】 配列番号2または配列番号4のいずれか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産生する、ハイブリドーマ。

【請求項27】 請求項23または25に記載の抗CD20/IgEレセプター様抗体またはフラグメントを使用して、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの量を検出または定量する、方法。

【請求項28】 少なくとも1つのポリペプチドを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2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号4のいずれかの少なくとも1つに示すアミノ酸配列のフラグメント；ならびに

(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29】 抗体またはそのフラグメントである、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項30】 ヒト化抗体である、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項31】 ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項32】 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28に記載の選択的結合因子。

【請求項33】 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28に記載の選択的結合因子。

【請求項34】 キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項35】 CDRグラフト化抗体またはそのフラグメントである、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項36】 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28に記載の選択的結合因子。

【請求項37】 可変領域フラグメントである、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項38】 FabまたはFab'フラグメントである、請求項37に記載の可変領域フラグメント。

【請求項39】 選択的結合因子またはそのフラグメントであって、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドについての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40】 検出可能な標識に結合している、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項41】 CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項42】 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、患者に、請求項28に記載の有効量の選択的結合因子を投与する工程を包含する、方法。

【請求項43】 動物を、配列番号2または配列番号4のいずれかからなる

群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドで免疫することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項44】 請求項1、2または3に記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーム。

【請求項45】 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46】 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、可溶化剤、安定剤または抗酸化剤である、請求項45に記載の組成物。

【請求項47】 前記ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列を含む、請求項46に記載の組成物。

【請求項48】 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49】 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49に記載のポリペプチド。

【請求項50】 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、請求項49に記載のポリペプチド。

【請求項51】 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52】 前記核酸分子が、ウイルスベクターに含まれる、請求項51に記載の組成物。

【請求項53】 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54】 異種アミノ酸配列に融合された請求項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55】 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54に記載の融合ポリペプチド。

【請求項56】 医学的状态を処置、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を、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57】 被験体における病理学的状態または病理学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または3に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現の、サンプル中での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、病理学的状態または病理学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58】 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

を備え、該細胞が、請求項13、14または15に記載のタンパク質を分泌し、そして該膜が、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59】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適切な膜；および

(b) 請求項13、14または15に記載の該膜内にカプセル化されたCD20/IgEレセプター様ポリペプチド

を備え、該膜が、該ポリペプチドに対して透過性である、デバイス。

【請求項60】 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) 該化合物に対する該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61】 動物における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62】 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哺乳動物。

【請求項63】 CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの発現が減少する、請求項1、2または3に記載の核酸分子の破壊を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項64】 CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの生物学的活性のアンタゴニストを同定する方法であって、以下の工程：

(a) 化合物とCD20/IgEレセプター様ポリペプチドとを接触させる工程；

(b) 該化合物の存在下で、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの生物学的活性を検出する工程；および

(c) 該化合物の存在下および非存在下で、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの生物学的活性のレベルを比較する工程、
を包含する、方法。

【請求項65】 前記化合物が、低分子、ペプチド、タンパク質、炭水化物、または抗体である、請求項64に記載の方法。

【請求項66】 請求項1、2、または3に記載の核酸分子を動物に投与する工程を包含する、動物におけるポリペプチドのレベルを調節する方法。

【請求項67】 CD20/IgEレセプター様ポリペプチド活性のアンタゴニストであって、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドについての特異性を有する、CD20/IgEレセプター様選択的結合因子、低分子、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびペプチドまたはそれらの誘導体からなる群より選択される、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド活性のアンタゴニスト。

【請求項68】 CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの細胞産生を減少させる方法であって、請求項67に記載のアンタゴニストをコードする核酸

で細胞を形質転換またはトランスフェクトする工程を包含する、方法。

【請求項69】 請求項68に記載の方法であって、前記アンタゴニストがアンチセンス試薬であって、該試薬が、CD20/IgEレセプター様mRNAに結合し得る一本鎖核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを含む、方法。

【請求項70】 請求項1～3のいずれか1項に記載の、固体支持体に付着されたポリヌクレオチド。

【請求項71】 請求項1～3のいずれか1項に記載の少なくとも1つのポリペプチドを含むポリヌクレオチドのアレイ。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(関連出願)**

本願は、2000年11月27日に出願された米国特許出願第09/723,258号の一部継続であり、この出願は、2000年3月30日に出願された仮出願第60/193,728号の優先権を主張する。両方の出願は本明細書中で参考として援用されている。

【0002】**(発明の分野)**

本発明は、新規なCD20/IgEレセプター様ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドを産生するための、ベクター、宿主細胞、選択的結合因子および方法に関する。CD20/IgEレセプター様ポリペプチドと関連する疾患の診断および処置のための方法もまた提供される。

【0003】**(発明の背景)**

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術的進歩は、ヒトゲノムの解読に基づいた新規の治療剤の発見を大きく加速した。現在では、高速の核酸配列決定技術により、前例のない速度で配列情報が作製され得、そしてコンピュータ分析と結合されて、ゲノム全体へと重複する配列を集合させることが可能であり、そしてポリペプチドコード領域の同定が可能である。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の目印に対する相同性の程度を決定することを可能にし得る。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。改変体およびその誘導体を作製するための核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤として使用するために有利な特性を産物に付与し得る。

【0004】

過去10年間にわたるゲノム研究における著しい技術的進歩にも関わらず、ヒ

トゲノムに基づいた新規の治療剤の開発に対する可能性は、未だ広範には実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド（これらは、治療的分子に対して「標的」として機能し得る）は、依然として同定されていない。さらに、多くのヒト遺伝子由来のポリペプチド産物の構造分析および機能分析が、未だ行われていない。

【0005】

従って、診断的または治療的な利点を有する、新規なポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【0006】

（発明の要旨）

本発明は、新規のCD20/IgEレセプター様核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0007】

本発明は、以下からなる群から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（SEQ ID NO：）1または3のいずれかに記載のヌクレオチド配列；

（b）配列番号2または配列番号4のいずれか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）中程度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、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

（d）（a）～（c）のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

【0008】

本発明はまた、以下からなる群から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または配列番号4のいずれか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、ここでこのポリペプチドは、GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群から選択されるコンピュータプログラムを使用して決定される場合に、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のコードされるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1または3のいずれか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、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、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1もしくは配列番号3、(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、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、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1もしくは配列番号3、または(a)~(d)のヌクレオチド配列；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)~(d)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、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a)~(e)のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

【0009】

本発明はさらに、以下からなる群から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2または配列番号4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、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4

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、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4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、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端および/またはN末端の切断 (truncation) を有する、配列番号2または配列番号4のいずれか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、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、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末端切断およびN末端切断からなる群から選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号4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、ここでこのポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のコードされるポリペプチドの活性を有する、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、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)～(e)のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

【0010】

本発明はまた、以下からなる群から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2または配列番号4のいずれかのオルソログ (ortholog) についてのアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2

または配列番号4に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号4のいずれか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、ここでこのポリペプチドは、GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群から選択されるコンピュータープログラムを使用して決定される場合に、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載の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、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列のフラグメント；

(d) 配列番号2もしくは配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列、または(a)~(b)のうちの少なくとも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についてのアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0011】

本発明はさらに、以下からなる群から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つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、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2または配列番号4

のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端および/またはN末端の切断を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端切断およびN末端切断からなる群から選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドは、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0012】

また、前述の段落の上記(a)～(e)のポリペプチド配列を含む融合ポリペプチドも提供される。

【0013】

本発明はまた、本明細書中に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に記載の組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびこの宿主細胞を培養する工程ならびに必要な応じてそのようにして産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドを産生する方法を提供する。

【0014】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチド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、本発明によって包含される。CD20/IgEレセプター様核酸分子は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの発現およびレベルの増加(これは、循環レベルの増加を含み得る)を可能にする様式で、動物中に導入される。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。

【0015】

また、本発明のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの誘導体が提供される。

【0016】

本発明において提供されるCD20/IgEレセプター様ポリペプチドのアナログは、配列番号2または4のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの保守的および/非保守的アミノ酸置換から生じる。このようなアナログとして、例えば、配列番号2または4の86位のアミノ酸がグリシン、プロリン、またはアラニンであるか、配列番号2または4の95位のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン、アラニン、またはチロシンであるか、配列番号2または4の121位のアミノ酸がアスパラギンまたはグルタミンであるか、配列番号2または4の128位のアミノ酸がアラニン、バリン、イソロイシン、またはロイシンであるか、配列番号2または4の103位のアミノ酸が、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、アラニン、フェニルアラニン、またはノルロイシンである、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドが挙げられる。

【0017】

さらに、本発明のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドを特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が提供される。このような抗体、ポリペプチド、ペプチドおよび低分子は、アゴニスト性またはアンタゴニスト性であり得る。

【0018】

さらに、本発明のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドを特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が提供される。このような抗体、ポリペプチド、ペプチドおよび低分子は、アゴニスト性またはアンタゴニスト性であり得る。

【0019】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチドまたは選択的結合因子、および1以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物もまた、本発明によって包含される。この薬学的組成物は、本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドの治療的有

効量を提供するように使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0020】

本発明のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドおよび核酸分子を使用して、本明細書中に列挙された疾患および障害を含む疾患および障害を処置、予防、改善、診断、および/または検出し得る。

【0021】

本発明は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの異常なレベルによって引き起こされるかまたは異常なレベルから生じる、被験体における病理学的状態または病理学的状態に対する感受性の診断を包含し、これは、サンプル中のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの発現の存在または量を検出する工程；および、正常な被験体またはより以前の時期の被験体のいずれかに由来する生物学的サンプル、組織サンプル、または細胞サンプルにおけるこのポリペプチドのレベルを比較する工程を包含し、ここで病理学的状態に対する感受性は、このポリペプチドの発現の存在または量に基づく。

【0022】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの発現を調節する方法およびレベルを調整（すなわち、増加または減少）する方法もまた、本発明によって包含される。1つの方法は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド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。別の方法では、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの発現を調節または調整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されるような、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。

【0023】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドは、そのリガンドを同定するために用いられ得る。種々の形態の「発現クローニング」が、レセプターに対するリガンドをクローニングするために用いられている。例えば、Davis et al., Cell, 87: 1161-1169 (1996)を参照のこと。これらおよび他のCD20/IgEレセプター様リガンドクローニング実験は、本明

細書中でより詳細に記載される。CD20/IgEレセプター様リガンドの単離は、CD20/IgEレセプター様シグナル伝達経路の新規のアゴニストおよび/またはアンタゴニストの同定または開発を可能にする。

【0024】

本発明はさらに、生物学的サンプル、組織サンプル、または細胞サンプル中のCD20/IgEレセプター様核酸の存在を決定する方法を包含する。これらの方法は、CD20/IgEレセプター様核酸を含むと疑われる生物学的サンプルを提供する工程；生物学的サンプルと本発明の診断試薬を、診断試薬がこの生物学的サンプル中のCD20/IgEレセプター様核酸とハイブリダイズする条件下で接触させる工程；生物学的サンプル中のCD20/IgEレセプター様核酸と診断試薬との間のハイブリダイゼーションを検出する工程；および生物学的サンプルと診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルと、既知の濃度のCD20/IgEレセプター様核酸と診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルとを比較する工程を包含する。これらの方法により検出されるポリヌクレオチドは、CD20/IgEレセプター様DNAまたは/およびCD20/IgEレセプター様RNAであり得る。

【0025】

本発明は、CD20/IgEレセプター様生物学的活性のアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法を提供し、この方法は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドと低分子化合物を接触させる工程、およびこれらの低分子の存在および非存在下でCD20/IgEレセプター様生物学的活性を測定する工程を包含する。これらの低分子は、天然に存在する医薬化合物であり得るか、またはコンビナトリアル化学ライブラリーに由来し得る。特定の実施形態において、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドと相互作用してその活性を調節するタンパク質、ペプチド、糖類、脂質、または低分子であり得る。

【0026】

アゴニストまたはアンタゴニストとして、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに対するリガンド、可溶性CD20/IgEレセプター様ポリペプチド

、抗CD20/IgEレセプター様選択的結合因子（例えば、抗体およびその誘導体）、低分子、ペプチドおよびCD20/IgEレセプター様ポリペプチドに結合し得るその誘導体、もしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されない（これらの中の任意のものが、1つ以上の疾患または障害（本明細書中に開示されるものを含む）を処置するために用いられ得る）。

【0027】

本発明はまた、患者での移植に適した膜；およびをその膜にカプセル化された細胞を備えるデバイスを提供する（ここで、この細胞は、本発明のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドを分泌し、この膜は、タンパク質産物に対して浸透性であり、この細胞に有害な物質に対して不浸透性である）。本発明はさらに、患者での移植に適した膜およびをその膜にカプセル化されたCD20/IgEレセプター様ポリペプチドを備えるデバイスを提供する（この膜はこのペプチドに対して浸透性である）。

【0028】

本発明は、固体支持体に取り付けられたCD20/IgEレセプター様ポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、少なくとも1つのCD20/IgEレセプター様ポリヌクレオチドを含むアレイを提供する。

【0029】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の見出しは、構成上の目的のためのみであり、そしてそこに記載される内容を限定するように解釈されるべきではない。本願において列挙される全ての参考文献が、明確に、本明細書中に参考として援用される。

【0030】

（定義）

用語「CD20/IgEレセプター様遺伝子」または「CD20/IgEレセプター様核酸分子」また「CD20/IgEレセプター様ポリヌクレオチド」とは、配列番号1または配列番号3のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2または配列番号4のいずれか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-1740（アメリカンタイプカルチャー

コレクション(ATCC)10801 University Blvd. Manassas VAに2000年4月19日に寄託された)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。

【0031】

用語「CD20/IGEレセプター様ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、以下が挙げられる：CD20/IGEレセプター様ポリペプチド対立遺伝子改変体、CD20/IGEレセプター様ポリペプチドオルソログ、CD20/IGEレセプター様ポリペプチドスプライス改変体、CD20/IGEレセプター様ポリペプチド改変体、およびCD20/IGEレセプター様ポリペプチド誘導体であって。CD20/IGEレセプター様ポリペプチドは、本明細書中に定義されるように、成熟ポリペプチドであり得、そして調製方法によっては、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。

【0032】

用語「CD20/IGEレセプター様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。

【0033】

用語「CD20/IGEレセプター様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2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチド、CD20/IGEレセプター様ポリペプチド対立遺伝子改変体、CD20/IGEレセプター様ポリペプチドオルソログ、CD20/IGEレセプター様ポリペプチドスプライス改変体またはCD20/IGEレセプター様ポリペプチド改変体をいう。

【0034】

用語「CD20/IgEレセプター様ポリペプチドフラグメント」は、アミノ末端での短縮(リーダー配列を有しても有しなくてもよい)および/または配列

番号2または4に示されるポリペプチド、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド対立遺伝子改変体、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドオルソログ(ortholog)、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドスプライス改変体、および/または配列番号2または4のいずれかに示されるCD20/IgEレセプター様ポリペプチドアミノ酸配列と比較して1つ以上のアミノ酸付加または置換もしくは内部欠失(ここで、得られるポリペプチドは、少なくとも6個以上のアミノ酸長である)を含むCD20/IgEレセプター様ポリペプチド改変体のカルボキシ末端での短縮を含むポリペプチドをいう。CD20/IgEレセプター様ポリペプチドフラグメントは、オルタナティブRNAスプライシングまたはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの膜貫通形態または膜結合形態について、好ましいフラグメントとして、膜貫通または膜結合ドメインを欠くような可溶性形態が挙げられる。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より多いアミノ酸が挙げられる。このように生成されたポリペプチドフラグメントは、約25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CD20/IgEレセプター様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、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに対する抗体を作製するために用いられ得ることが理解される。

【0035】

用語「CD20/IgEレセプター様融合ポリペプチド」とは、本明細書中に定義されるような、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチド、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドフラグメント、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドオルソログ、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド改変体、またはCD20/IgEレセプター様ポリペプチド誘導体の、アミノ末端またはカルボキシル末端での1つ以上のアミノ酸(例えば、異種タンパク質または異種ペプチド)の融合体をいう。用語「CD20/IgEレセプタ

「様融合ポリペプチド」とはまた、本明細書中に定義されるような、CD20 / IGEレセプター様ポリペプチド対立遺伝子改変体またはCD20 / IGEレセプター様ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端での、1つ以上のアミノ酸の融合体をいう。

【0036】

用語「CD20 / IGEレセプター様ポリペプチドオルソログ」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるCD20 / IGEレセプター様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、マウスおよびヒトのCD20 / IGEレセプター様ポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0037】

用語「CD20 / I g E - レセプター様ポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるCD20 / I g E - レセプター様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ッシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をいう。

【0038】

用語「CD20 / I g E - レセプター様ポリペプチド改変体」は、配列番号2または配列番号4（リーダー配列を有するかまたは有さない）のいずれかに示されるCD20 / I g E - レセプター様ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、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/またはCD20 / I g E - レセプター様ポリペプチドフラグメント）、および/または付加（例えば、内部付加および/またはCD20 / I g E - レセプター様融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むCD20 / I g E - レセプター様ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、CD20 / I g E - レセプター様ポリペプチド対立遺伝子改変体、CD20 / I g E - レセプター様ポリペプチドオルソログ、およびCD20 / I g E - レセプター様ポリペプチドスプライス改変体）か、または、人工的に構築され得る。このようなCD20 / I g E - レセプター様ポリペプチド改変体は、配列番号1または配列番号3のいずれかに示されるDNA配列から変化する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、または1～5、または1～10、または1～15、または1～20、または1～25、または1～50、または1～75、または1～100、または100より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および/または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

【0039】

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、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し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。上記の特異的結合反応は、抗原が、高度に選択的な様式で、その対応する抗体と反応し、そして他の抗原によって惹起され得る多数の他の抗体と反応しないことを示すことを意味する。

【0040】

用語「生物学的に活性なCD20/IgE-レセプター様ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を有するCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドをいう。一般に、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド、そのフラグメント、改変体、および誘導体は、配列番号2または配列番号4に示されるようなCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を有する。さらに、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；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。

【0041】

用語「有効量」および「治療有効量」は、各々、本明細書中に示されるCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドまたはCD20/IgE-レセプター様核酸分子の量をいう。

【0042】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞における使用に適切であり、そして異種核

酸配列の発現を、指示および/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。

【0043】

用語「宿主細胞」を用いて、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。この用語は、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子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

【0044】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、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間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定されるように、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、2つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的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」)により取り扱われたギャップ整列(存在する場合)との間の一致の同一パーセントを評価する。

【0045】

用語「類似性」は、概念に関するが、「同一性」とは対照的に、同一的一致および保存的置換の一致の両方を含む類似性の基準をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば10/20個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場合、パーセント同一性および類似性は、どちらも50%である。同じ例において、保存的置換であるさらに5つの位置が存在する場合、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセント類似性は75%(15/20)である。したがって、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド間の類似性の程度は、これらの2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

【0046】

用語「単離された核酸分子」とは、(1)総DNAが供給源細胞から単離される場合に、これが天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または

他の物質の少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子、(2)「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、(3)天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、または(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在し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、それが天然に関連する少なくとも1つの混入核酸分子を実質的に含まない。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、任意の他の混入核酸分子、または天然の環境において見出される他の混入物(これらは、ポリペプチド産生におけるその使用、またはその治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)を実質的に含まない。

【0047】

用語「単離されたポリペプチド」とは、(1)供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から単離された本発明のポリペプチド、(2)「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に連結しない(共有結合的または非共有結合的相互作用によって)、本発明のポリペプチド、(3)天然には連結しないポリペプチドに作動可能に連結(共有結合的または非共有結合的相互作用によって)する、本発明のポリペプチド、または(4)天然には存在し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、任意の他の混入ポリペプチドまたは天然の環境において見出される他の混入物を実質的に含まない。好ましくは、単離されたポリペプチドは、その治療的用途、診断用途、予防用途または研究用途と干渉する、その天然の環境において見出される任意の他の混入ポリペプチドまたは他の混入物が、実質的にない。

【0048】

用語「成熟CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドをいう。成熟CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドはまた、他の改変(例えば、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ッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N結合型および/またはO結合型グリコシル化など)を含み得る。

【0049】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNA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いずれかから形成される分子を含み、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 (pseudoisocytosine)、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 - プロモウラシル、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、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、2 - チオシトシン、および2, 6 - ジアミノプリン。

【0050】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的物質と関連して使用される場合、天然において見出され、そしてヒトによって操作されていない物質をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、

天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された物質をいう。

【0051】

用語「作動可能に連結された」を用いて、本明細書中では、隣接配列の配置をいい、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成または構築される。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および/または翻訳を行うことが可能であり得る。例えば、コード配列は、このプロモーターがコード配列の転写を指示し得る場合に、プロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と連続する必要はない。したがって、例えば、介在する非翻訳性であるが転写される配列が、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」されているとみなされ得る。

【0052】

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、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのCD20/IgE-レセプター様ポリペプチド、CD20/IgE-レセプター様核酸分子、またはCD20/IgE-レセプター様選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な1つ以上の処方物質をいう。

【0053】

用語「選択的結合因子」とは、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドに特異性を有する分子(単数または複数)をいう。選択的結合因子としては、公知の技術(酵素切断、ペプチド合成または組換え技術を含むが、これらに限定されない)によって提供されるポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、キメラ抗体、CDR移植抗体、可溶性形態または結合形態で標識され得る抗体に対する抗イデオタイプ(抗Id)抗体のような抗体、ならびにそのフラグメント、領域、または誘導体が挙げられる。本発明のCD20/IgE-レセプター様選択的結合因子は、例えば、CD20/IgE様レセプターの一部を結合し得る。

【0054】

本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子の、ヒトCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドに結合し、かつヒトの非CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載されるようなポリペプチドのオルソログ(すなわち、その種間変形(例えば、マウスポリペプチドおよびラットポリペプチド))に結合し得ることが、理解される。

【0055】

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド、フラグメント、改変体、および誘導体を使用して、当該分野で公知の方法を用いてCD20/IgE-レセプター様選択的結合因子を調製し得る。従って、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを結合する抗体および抗体フラグメントは、本発明の範囲内である。抗体フラグメントは、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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)によって産生されるフラグメントが挙げられる。これらの抗体は、例えば、ポリクローナル単一特異的抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、単鎖抗体、および/または二重特異的抗体であり得る。

【0056】

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の配列の獲得および移入をいう。

【0057】

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、その外因性DNAが細胞

膜の内側に導入されている場合、「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が、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、1973, *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。

【0058】

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、新しいDNAを含むように改変されている場合、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改変された場合、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、その形質転換DNAは、細胞の染色体へ物理的に組み込むことによってその細胞のDNAと組み換わり得るか、複製されない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し得る。細胞は、そのDNAが細胞の分裂と共に複製される場合、安定に形質転換されているとみなされる。

【0059】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移す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。

【0060】

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連した核酸分子が、配列番号1または配列番号3のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を包含すること、および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包含することが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号4のいずれかにおけるポリペプチド

と比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および/もしくは欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。

【0061】

フラグメントは、配列番号2または配列番号4のいずれかのポリペプチドの少なくとも約25個連続したアミノ酸、または少なくとも約50個のアミノ酸、または少なくとも約75個のアミノ酸、または少なくとも約100個のアミノ酸、または少なくとも約100個のアミノ酸のポリペプチドをコードする分子を包含する。

【0062】

さらに、関連したCD20/IgE-レセプター様核酸分子はまた、本明細書中で定義したとおりの中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1、もしくは配列番号3のいずれかの核酸分子またはポリペプチドをコードする分子の十分に相補的な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を包含し、このポリペプチドは、配列番号2もしくは配列番号4、または本明細書中に定義したとおりの核酸フラグメント、または本明細書中に定義したとおりのポリペプチドをコードする核酸フラグメントのいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。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CD20/IgE-レセプター様配列を用いてcDNA、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーを関連した配列についてスクリーニングして調製され得る。CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載されるとおりの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、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

【0063】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ顕著に不一致のDNAのハイブリダイゼーションを排除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

ンのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムまたは42 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrook, Fritschおよび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。

【0064】

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）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの割合が影響される。他の薬剤は、非特異的および/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させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、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 (NaDodSO₄ または SDS)、ficoll、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（または別の非相補的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用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、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、pH 6.8～7.4で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの割合は、pHからほぼ独立する。Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited (Oxford, England)) を参照のこと。

【0065】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一致程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、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ために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって評価され得る：

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

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中でのナトリウムイオンのモル濃度であり、G + C%は、ハイブリッド中での(グアニン + シトシン)塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、1%の不一致毎に約1 下げられる。

【0066】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50 ~ 65 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムまたは37 ~ 50 での0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015 Mナトリウムイオン中での50 という「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を可能にする。

【0067】

「高度に」ストリンジェントな条件と「中程度に」ストリンジェントな条件との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、0.015 Mナトリウムイオン(ホルムアミドなし)では、完全に一致した長さのDNAの融解温度は、約71 である。65 で(同じイオン強度で)の洗浄を用いると、このことは、約6%の不一致を可能にする。より遠く関連した配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高

くし得る。

【0068】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1M NaCl*中での融解温度の良好な推定は、以下によって与えられる：

$$T_m = A - T \text{塩基対あたり} 2 + G - C \text{塩基対あたり} 4$$

*6×クエン酸ナトリウム塩(SSC)中での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。

【0069】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、6×SSC、0.1% SDS中でのそのオリゴヌクレオチドの T_m よりも0~5低い温度においてである。

【0070】

別の実施形態では、関連した核酸分子は、配列番号1もしくは配列番号3のいずれかに示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約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2もしくは配列番号4のいずれかに示すとおりのポリペプチドに対して約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本質的にこれからなる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1もしくは配列番号3のいずれかに示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号2、もしくは配列番号4のいずれかに示されるとおりのポリペプチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。

【0071】

核酸配列における相違は、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的および/または非保存的改変をもたらし得る。

【0072】

配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する、対応する改変）は、天然に存在するCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを生じる。対照的に、CD20/IgE-レセプター様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改変は、以下を維持することに対するその影響が顕著に異なる、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得る：（a）例えば、シートコンホメーションもしくはヘリックスコンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、（b）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖のかさ。

【0073】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんど影響がないかまたは全く影響がないような、非ネイティブ残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。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、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンによって置換され得る。

【0074】

保存的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。本明細書中に記載される核酸分子およびポリヌクレオチド分子は、化学的に合成され得、そして組換え手段によって産生され得ることが当業者によって理解される。

【0075】

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: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- 2) 中性の親水性: Cys、Ser、Thr;
- 3) 酸性: Asp、Glu;
- 4) 塩基性: Asn、Gln、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。

【0076】

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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドオルソログと相同性であるヒトCD20/IgEレセプター様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。

【0077】

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 (hydropathic index) が、考慮され得る。各アミノ酸は、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。

【0078】

タンパク質に相互作用的な生物学的機能を与える疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、当該分野で理解される。Kyteら、J.Mol.Biol., 157:105-131, 1982。特定のアミノ酸が、類似した疎水性親水性の指

標またはスコアを有する他のアミノ酸に置換され得、そしてなお、類似した生物学的活性を保持するということは公知である。疎水性親水性指標に基づいて変更を作製する際、疎水性親水性指標が ± 2 内であるアミノ酸の置換が好ましく、疎水性親水性指標が ± 1 内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして疎水性親水性指標が ± 0.5 内であるアミノ酸置換がなおより特に好ましい。

【0079】

このような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こと、特に、それによって作製される生物学的に機能的に等価なタンパク質またはペプチドが本発明における場合と同様に免疫学的な実施形態において使用されることが意図される場合になされることもまた、当該分野で理解される。タンパク質の最も大きな局所平均親水性は、隣接アミノ酸の親水性によって支配される場合、その免疫原性および抗原性（すなわち、そのタンパク質の生物学的特性）と相関する。

【0080】

以下の親水性値は、これらのアミノ酸残基に対して割りあてられる：アルギニン（ $+3.0$ ）；リジン（ $+3.0$ ）；アスパラギン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；グルタミン酸（ $+3.0 \pm 1$ ）；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 ）；トリプトファン（ -3.4 ）。類似した親水性値に基づいて変更を作製する際、親水性値が ± 2 内であるアミノ酸の置換が好ましく、親水性値が ± 1 内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして親水性値が ± 0.5 内であるアミノ酸置換がなおより特に好ましい。当業者はまた、親水性に基づいて、一次アミノ酸配列からエピトープを同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」ともいわれる。

【0081】

所望のアミノ酸置換（保存的または非保存的にかかわらず）は、そのような置

換が所望されるときに当業者によって決定され得る。例えば、アミノ酸置換は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの重要な残基を決定するために使用され得るか、または本明細書中に記載されるCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させるために使用され得る。

【0082】

例示的なアミノ酸置換を、表Iに示す。

【0083】

【表1】

Table I アミノ酸置換

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, β -D-アラニン	Leu
Leu	β -D-アラニン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-ジアミノ酸, 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, β -D-アラニン	Leu

当業者は、周知技術を用いて配列番号2または配列番号4のいずれかに示されるポリペプチドの適切な改変体を決定し得る。例えば、生物学的活性を崩壊させることなく変化され得る分子の適切な領域を予想し得る。当業者はまた、たとえ比較的保存された領域においても、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したアミノ酸で代用し得る（保存的アミノ酸残基置換）ことを理解する。従って、生物学的活性または構造に対して重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を崩壊させることなく、またはポリペプチド構造に逆の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。

【0084】

例えば、同じ種由来または他の種由来の、類似した活性を有する類似したポリペプチドが既知の場合、当業者は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似したポリペプチドと比較し得る。そのような比較を用いて、当業者は、類似したポリペプチドの間で保存されているその分子の残基および部分を同定し得る。そのような類似したポリペプチドに対して保存されていないCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの領域における変化は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの生物学的活性および/または構造に逆の影響をおそらくほとんど与えないことが理解される。当業者はまた、たとえ比較的保存された領域においても、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したアミノ酸で代用し得る（保存的アミノ酸残基置換）ことを理解する。従って、生物学的活性または構造に対して重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を崩壊させることなく、またはポリペプチド構造に逆の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。

【0085】

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予測するために、当業者は、活性に重要であると考えられる領域を標的とし得る。例えば、同じ種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、当業者は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を行った後、当業者は、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決定し得る。当業者は

、保存されないCD20/IgEレセプター様分子の領域での変化が生物学的活性および/または構造に不利に影響しそうにないことを知っている。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を保持するしつつ、天然に存在する残基に代わって化学的に類似するアミノ酸でおそらく置換し得る（例えば、保存的アミノ酸残基置換）。

【0086】

さらに、活性または構造に重要である類似したポリペプチドにおける残基を同定する、構造-機能研究を当業者は、再検討し得る。そのような比較を考慮して、当業者は、類似したポリペプチドにおいて活性もしくは構造に重要であるアミノ酸残基に対応する、CD20/IgEレセプター様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、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドのそのような予測された重要なアミノ酸残基に関して、化学的に類似したアミノ酸置換を選択し得る。

【0087】

当業者はまた、類似したポリペプチドにおける三次元構造に関連して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。そのような情報を考慮して、当業者は、三次元構造についてCD20/IgEレセプター様ポリペプチドのアミノ酸残基のアラインメントを推測し得る。当業者は、タンパク質の表面上であると推測されるアミノ酸残基に対して急激な変更を作製しないように選択し得る。なぜなら、そのような残基は、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、各所望のアミノ酸残基において単一アミノ酸置換を含む試験改変体を作製し得る。次いで、この改変体は、当業者に公知の活性アッセイを用いてスクリーニングされ得る。そのような改変体を使用して、適切な改変体に関する情報を集め得る。例えば、当業者は、特定のアミノ酸残基に対する変更が、崩壊された活性、不適当に減少された活性、または不適切な活性を生じることを発見した場合、そのような変更を有する改変体は、回避される。言い換えると、そのような慣用的な実験から集められた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が単独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。

【0088】

多数の科学刊行物が、二次構造の推測に向けられている。Moult J.、*Curr. Op. in 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、*Ann. Rev. Biochem.*、47:251-276およびChouら、*Biophys. J.*、26:367-384、1979を参照のこと)。さらに、コンピュータプログラムが、現在利用可能であり、タンパク質の抗原部位およびエピトープの中心領域の予測によって補助する。例として、Jameson-Wolfe分析に基づくプログラム(Jamesonら、*Comput. Appl. Biosci.*、4(1):181-186(1988)およびWolfeら、*Comput. Appl. Biosci.*、4(1):187-191(1988)、PepPlot(登録商標)プログラム(Brutlagら、*CABS* 6:237-245(1990)、およびWeinbergerら、*Science* 228:740-742(1985)、およびタンパク質の3次構造の予測のための他の新しいプログラム(Fetrowら、*Biotechnology*、11:479-483)が含まれる。

【0089】

さらに、コンピュータプログラムが、現在利用可能であり、二次構造の予測によって補助する。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):244-247、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ける限定された数の折り畳みが存在すること

、および一旦構造の臨界の数が決定されると、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)。

【0090】

二次構造を予測するさらなる方法としては、「スレッディング (threading)」 (Jones, D.、Curr. Opin. Struct. Biol.、7(3):377-87、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「進化的連鎖 (evolutionary linkage)」 (Home、前出、およびBrenner、前出を参照のこと) が、挙げられる。

【0091】

本発明のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドアナログは、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドのアミノ酸配列を関連ファミリーのメンバーと比較することにより決定され得る。例示的CD20/IgEレセプター様ポリペプチド関連ファミリーのメンバーとしては、ヒトTM₄、ヒトIgERb、HURp4、IgER、HTPEF86、ヒトCD20、HTM4SF5およびHTAL6が挙げられる。この比較は、Pileup整列 (Wisconsin GCG Program Package) を使用すること、または保存領域および非保存領域内での複数のファミリーメンバーとの等価 (重複) 比較を使用することによって、達成され得る。

【0092】

図3に示されるように、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号2および4) は、既知のヒトCD20/IgEレセプターファミリーメンバーと整列される。他のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドアナログは、これらの方法もしくは当業者に公知の他の方法を使用して決定

され得る。これらの重複配列は、さらなるCD20/IgEレセプター様アナログを生じる保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換についての指針を提供する。これらのアミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸からなってもよいし、もしくは天然に存在しないアミノ酸からなってもよいことが、理解される。例えば、可能性のあるCD20/IgEレセプター様アナログは、配列番号2または4の位置86におけるGly残基がProまたはAla残基に置換され、配列番号2または4の位置95におけるPhe残基がLeu、Val、Ile、Ala、またはTyr残基に置換され、そして/または配列番号2または4の位置103におけるIle残基がLeu、Val、Met、Ala、Pheまたはノルロイシンに置換されていてもよい。さらに可能性のあるCD20/IgEレセプター様アナログは、配列番号2または4の位置121におけるAsn残基がGln残基に置換され、そして/または配列番号2または4の位置128におけるAla残基がValに置換されていてもよい。LeuまたはIleは、残基である。

【0093】

好ましいCD20/IgEレセプター様ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が配列番号2、または配列番号4のいずれか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、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号4のいずれか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連結グリコシル化部位を含む。N連結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連結炭水化物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連結炭水化物鎖を除去する。1つ以上のN連結グリコシル化部位（代表的に、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連結部位が作製される、N連結炭水化物鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいCD20/IgEレセプター様改変体としては、1つ以上の

システイン残基が、配列番号2または配列番号4のいずれか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、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な配置に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、そして代表的には同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。

【0094】

さらに、配列番号2または配列番号4、あるいは他のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、同種ポリペプチドに融合してホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合してヘテロダイマーを形成し得る。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：CD20/IgEレセプター様融合ポリペプチドの検出および/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）；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2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは別のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドとは異なる治療活性を有するポリペプチド。

【0095】

融合は、配列番号2または配列番号4のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のIL1ra-Rポリペプチドの、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介してであってもよい。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アミノ酸残基である。リンカーまたはアダプター分子はまた、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位を有して設計されて、融合した部分の分離を可能にし得る。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。

【0096】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合する。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、ならびに相補的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、1989, Nature 337:525-31。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、および恐らく、胎盤移入さえものような機能を組み込み得る。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（融合CD20/IgEレセプター様ポリペプチド産性に適用可能な材料および方法を含む）。

【0097】

【表2】

TABLE II

治療後のFc融合			
Fcの形態	融合パートナー	治療関連	参考文献
IgG1	CD30-L のN末端	Hodgkin病 未分化型リンパ腫 T細胞白血病	米国特許第 5,480,981
2x2 Fcγ2a	IL-10	抗炎症 樹細胞拒絶	Zheng J. (1995), J. Immunol., 154: 5590-5600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher J. (1996), N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702; Van Zee J. (1996), J. Immunol., 156: 2221-2230
IgG, IgA, IgM, IgE (第一抗体以外 除去)	TNF レセプター	炎症 自己免疫疾患	米国特許第 5,808,029, September 15, 1998
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Capon J. (1989), Nature 337: 525-531
IgG1, IgG3	IL-2 のN末端	抗炎症 抗がん剤	Harvill J. (1995), Immunotech., 1: 95-105
IgG1	OPGの C末端	変性性関節症 骨密度	WO 97/23614, published July 3, 1997
IgG1	leptinの N末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
ヒト Ig G1	CTLA-4	抗免疫疾患	Linsley (1991), J. Exp. Med., 174:561-569

一例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、当業者に公知の方法を使用して、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド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、融合し得る。別の例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドフラグメント（例えば、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの推定細胞外部分）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、融合し得る。得られるCD20/IgEレセプター様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領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物より実質的に長いインビボでの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、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような特定の品質を改善するよう変更され得る。

【0098】

関連する核酸分子およびポリ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、Computational Molecular Biology (A.M. Lesk編、Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D.W. Smith編、Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A.M. GriffinおよびH.G. Griffin編、Humana Press 1994); G.von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer (M. GribskovおよびJ. Devereux編、M. Stockton Press 1991); ならびにCarilloら、1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0099】

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、試験される配列間での最大の適合を与えるために、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、公共に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。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、GCGプログラムパッケージ (GAP (Devereuxら、1984, Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University o

f Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-10)を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information(NCBI)および他の供給源(Altschulら、BLAST Manual(NCB NLM NIH, Bethesda, MD20894); Altschulら、1990、前出)から公共に利用可能である。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。

【0100】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のアライメントスキームは、これら2つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、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、選択された整列方法(GAPプログラム)は、特許請求されるポリペプチドの少なくとも50の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0101】

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、配列同一性の百分率が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合(アルゴリズムによって決定される「適合したスパン」)のために、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、平均対角の3倍として計算される:「平均対角」とは、使用される比較行列(comparison matrix)の対角の平均である;「対角」とは、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸適合に対して割り当てられた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(gap extension penalty)(これは通常、ギャップオープニングペナルティーの0.1倍である)、ならびにPAM 250またはBLOSUM 62のような比較行

列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、このアルゴリズムによって使用される (Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure (補遺3 1978) (PAM250比較行列); Henikoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19 (BLOSUM 62比較行列) を参照のこと)。

【0102】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータは、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53;

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoffら、前出)；

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

このGAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いるポリペプチド比較 (末端ギャップに対してはペナルティーがないこととともに) のためのデフォルトパラメータである。

【0103】

核酸分子配列比較についての好ましいパラメータとしては、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。

【0104】

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

【0105】

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、同一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、タンパク質 - タンパク質、タンパク質 - DNA）；さらに、比較が所定の配列対の間である（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。

【0106】

（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産生され得ることは、当業者によって認識される。

【0107】

（核酸分子）

核酸分子は、CD20/IgEレセプター様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）で容易に獲得され得る。

【0108】

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核酸分子およびこのような分子を

得るための方法を提供する。

【0109】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする遺伝子またはcDNAは、ゲノムライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングによってか、またはPCR増幅によって獲得され得る。CD20/IgEレセプター様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、同じ種からのオルソログ(ortholog)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、CD20/IgEレセプター様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1または配列番号3のいずれか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、CD20/IgEレセプター様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ェンシーの条件が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る偽陽性の数を最小にする。

【0110】

CD20/IgEレセプター様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提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細胞を同定する。

【0111】

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に従って、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させ得る。例えば、CD20/IgEレセプター様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、CD20/IgEレセプター様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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドは、大量に産生され得る。

【0112】

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、poly(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、CD20/IgEレセプター様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つの別個の領域に対して相補的である)が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこのcDNAに付加され、そしてこのポリメラーゼが、これら2つのプライマー間のcDNAの領域を増幅する。

【0113】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子(フラグメントまたは改変体を含む)を調製する別の手段は、Engelsら、1989, Angew. Chem. Intl. Ed. 28:716-734によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントと一緒に連結されて、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、この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を有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオ

ニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0114】

いくつかの場合において、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望であり得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマー（単数または複数）が所望の点変異を有する部位指向型変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成され得る（変異誘発技術の記載に関しては、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと）。Engelsら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0115】

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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコードン変更は、発現のために選択されるCD20/IgEレセプター様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、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される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）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先度に関する「Ecohigh.cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピューターアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI)によって提供される。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。

【0116】

他の実施形態において、核酸分子は、本明細書中に記載されるような保存的アミノ酸置換を有するCD20/IgEレセプター様改変体、1つ以上のN連結またはO連結グリコシル化部位の付加および/または欠失を含むCD20/IgEレセプター様改変体、1つ以上のシステイン残基の欠失および/または置換を有するCD20/IgEレセプター様改変体、あるいは本明細書中に記載されるようなCD20/IgEレセプター様ポリペプチドフラグメントをコードする。さらに、核酸分子は、本明細書中に記載されるCD20/IgEレセプター様改変体、フラグメント、および融合ポリペプチドの任意の組合せをコードし得る。

【0117】

(ベクターおよび宿主細胞)

CD20/IgEレセプター様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し得る。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)。CD20/IgEレセプター様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、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドが翻訳後修飾(例えば、グリコシル化および/またはリン酸化)されるか否かに一部依存する。そうである場合、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., 185巻、D.V. Goeddel, 編, Academic Press Inc., San Diego, CA(1990)を参照のこと。

【0118】

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」と呼ばれる)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ス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。

【0119】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、CD20/IgEレセプター様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；オリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、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）（これら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、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド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、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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドから除去され得る。

【0120】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または宿主細胞系統以外の種由来）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、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド発現を調節するために正常に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、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0121】

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、CD20/IgEレセプター様遺伝子隣接配列以外の、本明細書中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。

【0122】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、PCRを使用して、そして/あるいは適切なオリゴヌクレオチドならびに/または同じ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、隣接配列は得られ得る。隣接配列が公知でない場合、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(単数または複数)を含み得る大きなDNA断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でさえも使用する単離、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。

【0123】

複製起点は、代表的に、市販で購入した原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、いくつかの場合において、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、複製起点部位は、公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(製品番号303-3s、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、そして種々の起点（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クローニングベクターに有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターに必要とされない（例えば、SV40起点は、ただそれが初期プロモーターを含むので、しばしば、使用される）。

【0124】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に配置され、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、続いてポリ-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、またはなおベクターの一部として市販で購入されるが、これはまた、本明細書中に記載されるような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0125】

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。

【0126】

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により大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の染色体の連続的な生成の内にタンデムに反復されるプロセスである。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、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独特に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子とCD20/IgEレセプター様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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

【0127】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてシャイン・ダルガルノ配列（原核性物）またはコザック配列（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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドのプロモーターの3'側およびコード配列の5'側に配置される。シャイン・ダルガルノ配列は、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。多くのシャイン・ダルガルノ配列は、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、原核生物ベクターを使用して容易に合成され得る。

【0128】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞からCD20/IgEレセプター様ポリペプチド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、CD20/IgEレセプター様核酸分子のコード領域に位置するか、または直接CD20/IgEレセプター様ポリペプチドコード領域の5'末端に位置する。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性である任意のシグナル配列が、CD20/IgEレセプター様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、CD20/IgEレセプター様遺伝子またはcDNA核酸分子に対して同種（天然）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。大部分において、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からのCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの分泌は、分泌されたCD20/IgEレセプター様ポリペプチド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CD20/IgEレセプター様核酸分子の一部であり得る。

【0129】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなCD20/IgEレセプター様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CD20/IgEレセプター様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が本発明の範囲内に含まれる。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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセス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リーダーのグループ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。酵母分泌について、ネイティブなCD20/IgEレセプター様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が十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0130】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいような、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レ配列を加え得、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に対して)、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終タンパク質産物は、N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を切断する場合、所望のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

【0131】

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、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、CD20/IgEレセプター様遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない（大部分のcDNAについて）場合、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CD20/IgEレセプター様遺伝子に関してイントロンの位置は、イントロンが効果的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、CD20/IgEレセプター様cDNA分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側で、ポリ-A転写終結配列の5'側である。好ましくは、イントロン（単数または複数）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（任意のウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意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。

【0132】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には各々、宿主生物によって認識され、CD20/IgEレセプター様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の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）（一般的に、約100～1000bp内）に配置される非転写配列である。プロモーターは、通常、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1つにグループ化される。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からの増加したレベルの転写を開始する。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、CD20/IgEレセプター様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CD20/IgEレセプター様遺伝子プロモーター配列は、CD20/IgEレセプター様核酸分子の増幅および/または発現に指向させ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大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能であり、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、異種プロモーターが好ましい。

【0133】

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、 β -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、それによって、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配列にそれらを連結し得る。

【0134】

酵母宿主と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有利に使用される。哺乳動物宿主細胞と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。

【0135】

CD20/IgE-レセプター様遺伝子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 et al. 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 et al., 1980, Cell 22:787-97); ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-1445); メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); -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-Komaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31); または tacプロモーター (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25)。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 et al., 1984, Cell 38:639-46; Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); 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 et al., 1984, Cell 38:647-58; Adames et al., 1985, Nature 318:533-38; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol., 7:1436-44); 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 et al., 1986, Cell 45:485-95); 肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-76); 肝臓において活性な -フェトプロテイン質遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., 198

5, Mol. Cell. Biol., 5:1639-48; Hammerら, 1987, Science 235:53-58); 肝臓において活性な 1 - 抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら, 1987, Genes and Devel. 1:161-71); 骨髄性細胞において活性な α -グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら, 1985, Nature 315:338-40; Kolliasら, 1986, Cell 46:89-94); 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, 1987, Cell 48:703-12); 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, 1985, Nature 314:283-86); 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, 1986, Science 234:1372-78)。

【0136】

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CD20/IgE-レセプター様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 -フェー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、CD20/IgE-レセプター様核酸分子に対して5'位または3'位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。

【0137】

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。所望される隣接配列の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。

【0138】

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 Company, Carlsbad, 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。

【0139】

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™ TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen, Carlsbad, CA)、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはバキュロウイルス発現系のようなウイルスベクター (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech, Palo Alto, CA)が挙げられる。これらの組換え分子は、形質転換、トランスフ

エクシオン、感染、エレクトロポレーションまたは他の公知の技術を介して宿主細胞に導入され得る。

【0140】

ベクターが構築され、そしてCD20/IgE-レセプター様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。CD20/IgE-レセプター様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、DEAE-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、Sambrookら(前出)、上記に記載される。

【0141】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞(例えば、E. coli)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CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを合成し、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。

【0142】

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、American Type Culture Collection(ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA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受託番号CCL61)、CHO DHFR-細胞(Ur

laubら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4216-20)、ヒト胚性腎臓(HEK)293または293T細胞(ATCC受託番号CRL1573)、あるいは3T3細胞(ATCC受託番号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、サルのCOS-1(ATCC受託番号CRL1650)およびCOS-7(ATCC受託番号CRL1651)細胞株、およびCV-1(ATCC受託番号CCL70)細胞株である。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、ATCCより入手可能である。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。

【0143】

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受託番号33694)DH5、DH10、およびMC1061(ATCC受託番号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。

【0144】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチド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、S

accharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0145】

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, 1993, Biotechniques, 14: 810-17; Lucklow, 1993, Curr. Opin. Biotechnol. 4: 564-72; およびLucklowら, 1993, J. Virol., 67: 4566-79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA) である。

【0146】

グリコシル化CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを発現するために、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、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳汁中に得ることができる。CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを産生するために、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。

【0147】

(ポリペプチド産生)

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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素を含む。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必要とされるように血清および/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。

【0148】

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添加される。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スタメントによって指示される。例えば、選択マーカースタ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。

【0149】

宿主細胞によって産生されるCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの量は、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、限定しないが、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、高速液体クロマトグラフィー (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。

【0150】

CD20/IgE-レセプター様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場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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。

【0151】

宿主細胞の細胞質ゾルおよび/または核 (真核生物宿主細胞について) あるいは細胞質ゾル (細菌宿主細胞について) に位置するCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドについて、宿主細胞は、代表的に、機械的にか、または細胞内内容物を緩衝溶液中へ放出するための界面活性剤を用いて破碎される。次いで、

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドは、この溶液から単離される。

【0152】

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドが細胞内で産生される場合、細胞内物質（グラム陰性細菌に対する封入体を含む）は、当業者に公知の標準的技術のいずれかを用い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/または超音波破碎次いで遠心分離によって破碎されペリプラズム/細胞質の内容物を放出し得る。

【0153】

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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、細胞内膜および/または細胞外膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後のペレット物質において見出される。次いで、ペレット物質は、極端なpHで、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されて、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、溶解されたCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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, 1990, Meth. Enz., 182: 264-75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。

【0154】

いくつかの場合、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でなくても良い。ポリペプチドをその三次構造に「再折り畳み」または変換し、そして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、溶解されたポリペプチドを、一定のpH（通常は、7より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（chaotrope）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より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、塩化第二銅、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。多くの場合において、共溶媒が、再折り畳みの効率を増加するのに使用され得、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。

【0155】

封入体がCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後の上清中に見出される。ポリペプチドは、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。

【0156】

溶液からのCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン(CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド/ヘキサHis)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))をそのカルボキシル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対し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。

【0157】

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有して結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム(例えば、Qiagen(登録商標)ニッケルカラム)は、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド/ポリHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Pr

otocols in Molecular Biology § 10.11.8 (Ausubelら編, John Wiley & Sons, New York (1993))を参照のこと。

【0158】

さらに、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドは、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

【0159】

精製のための他の適切な手段としては、限定しないが、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 (molecular sieve chromatography)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、電気泳動 (ネイティブゲル電気泳動を含む)、続くゲル溶出、および分取用等電点電気泳動 (「Isoprime」machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA) が挙げられる。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術を、増加した純度を達成するために組み合わせ得る。

【0160】

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド (そのフラグメント、改変体、および/または誘導体を含む) はまた、Merrifieldら, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら, 1985, Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132; ならびに、Stewartおよび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。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含むかまたは有さずに合成され得る。化学的に合成されたCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドは、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CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドは、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た対応のCD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

【0161】

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを得る別の手段は、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用してモニターされ得る。

【0162】

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、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12297-303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。Roberts, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3: 268-73もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、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、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、この異種プールのオリゴヌクレオチドはそれぞれが、5'ランダム化配列、中央部の予備選択配列、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、所望の生物学的機能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、予め決定された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。

【0163】

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、確率論的な遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、その確率論的な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。

【0164】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Athersys, Inc.によって出願されたPCT/US98/20094(WO99/15650に記載される。これは、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同組換えまたは非正統的(illegitimate)組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、照射に供せられ、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に配置され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を引き起こす。

【0165】

これらの方法はまた、包括的なCD20/IgE-レセプター様ポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ(例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび生物全体のアッセイ(例えば、植物、マウスなど))において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0166】

(化学的誘導体)

CD20/IgE - レセプター様ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、本明細書中に記載された開示を考慮して、当業者によって調製され得る。CD20/IgE - レセプター様ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然に結合した分子の型または位置のいずれかにおいて異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然に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2もしくは配列番号4またはCD20/IgE - レセプター様ポリペプチド改変体のいずれか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、それが結合するタンパク質は、水性環境（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に含まれる。好ましくは、最終産物の調製物の治療学的用途のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0167】

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2kDaと約100kDaと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の際に、いくつかの分子が示された分子量より多く、いくつかは少ない分子量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5kDaと約50kDaの間、より好ましくは、約12kDaと約40kDaとの間、そして最も好ましくは、約20kDaと約35kDaとの間である。

【0168】

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 - 結合型またはO - 結合型炭水化物、糖、ホスフェート、ポリエチレングリコール（PEG）（これは、モノ - ($C_1 - C_{10}$)、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体化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、約6kDの低分子量デキストラン）、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）、およびポリビニルアルコール。共有結合した配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはCD20/IgEレセプター様ポリペプチド改変体のマルチマー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、本発明に包括される。

【0169】

一般に、化学的誘導体化は、タンパク質と活性化ポリマー分子とを反応させるために用いられる適切な条件下で実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に、(a)ポリペプチドと活性化ポリマー分子（例えば、反応性エステルまたはポリマー分子のアルデヒド誘導体）とを反応させる工程であって、この反応性が、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいはCD20/IgEレセプター様ポリペプチド改変体が、1つ以上のポリマー分子との結合を生じる条件下で行われる、工程、および(b)反応産物を得る工程、を包含する。最適反応条件は、公知のパラメーター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：タンパク質の比がより大きくなればなるほど、ポリマー分子との結合の割合がより多くなる。1つの実施形態において、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一のポリマー分子の部分を有し得る。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

【0170】

ポリペプチドのペグ化は、特に、例えば、以下の参考文献に記載されるような、当該分野で公知のペグ化反応のいずれかによって実施され得る：Francisら、Focus on Growth Factors, 3:4-10(1992); EP 0154316; EP 0401384および米国特許第4,179,337号。例えば、ペグ化は、本明細書において記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、アナログ反応水溶性ポリマー）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。アシル化反応について、選択されたポリマーは、単一反応性エステル基を有するべきである。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一反応性アルデヒド基を有するべ

きである。反応性アルデヒドは、例えば、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）であるか、またはモノC₁-C₁₀アルコキシもしくはそのアリア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）。

【0171】

別の実施形態において、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドは、ビオチンと化学的に結合し得、次いで、結合されたビオチン/CD20/IgEレセプター様ポリペプチド分子は、アビジンへの結合が可能となり、その結果、四価のアビジン/ビオチン/CD20/IgEレセプター様ポリペプチド分子を生じる。CD20/IgEレセプター様ポリペプチドはまた、ジニトロフェノール(DNP)またはトリニトロフェノール(TNP)に共有結合し得、そして得られた結合体は、抗DNPまたは抗TNP-IgMとともに沈澱して10の結合価の十量体の結合体を形成し得る。

【0172】

一般に、本発明のCD20/IgEレセプター様ポリペプチド誘導体の投与によって緩和され得るかまたは調節され得る状態は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドについて本明細書において記載される状態を含む。しかし、本明細書において開示されるCD20/IgEレセプター様ポリペプチド誘導体は、誘導体化されていない分子と比較した場合、さらなる活性、増強した生物学的活性もしくは減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加した半減期もしくは減少した半減期）を有し得る。

【0173】

（遺伝的に操作された非ヒト動物）

非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、もしくはヒツジ、または他の家畜）は、本発明の範囲内にさらに含まれ、ここで、ネイティブCD20/IgEレセプター様ポリペプチドをコードする遺伝子は、崩壊されており（「ノックアウト」）、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失する。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用いて調製され得る。

【0174】

本発明はさらに、非ヒト動物（例えば、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）を含み、ここで、この動物についてのCD20/IgEレセプター様遺伝子のネイティブな形態または異種CD20/IgEレセプター遺伝子のいずれかは、この動物によって過剰に発現され、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に記載されるような、周知の方法を用いて調製され得る。

【0175】

本発明はさらに、非哺乳動物を含み、ここで、本発明の1つ以上のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドについてのプロモーターは、1つ以上のネイティブCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの発現のレベルを変更するために、（例えば、相同組換え方法を用いることによって）活性化させるかまたは不活性化させるかのいずれかである。

【0176】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングのために用いられ得る。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の影響が測定され得る。例えば、薬物候補は、CD20/IgEレセプター様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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの量は、薬物候補への動物の曝露後、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、疾患または病的状態を、生じる得るか、または付随し得る。このような場合、遺伝子の発現を減少させる薬物候補の能力または病的状態を予防または抑制する薬物候補の能力を試験し得る。他の例において、特に代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の産生は、疾患または病的状態を、生じ得るか、または付随し得る。このような場合、このような代謝産物の産生を減少させる薬物候補の能力または病的状態を予防するかまたは抑制する薬物候補の能力を試験し得る。

【0177】

(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得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)上に配置される核酸の小型かつ高密度アレイである。アレイ内の各セルまたはエレメントは、その同種mRNAについてのハイブリダイゼーションのための標的として働くDNAの単一種の多数のコピーを有する。DNAマイクロアレイ技術を用いた発現プロファイリングにおいて、mRNAはまず、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。この物質は、この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が洗浄によって除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各標的DNAに特異的に結合する標識されたcDNAの量を定量化することによって可視化される。このように、幾千もの遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットかつ並列様式で定量化され得る。

【0178】

このハイスループット発現プロファイリングは、以下を含むが、これらに限定されない本発明のCD20/IgEレセプター様分子に関して、広い範囲の適用を有する：治療のための標的としてCD20/IgEレセプター様疾患関連遺伝子の同定および検証；CD20/IgEレセプター様分子およびそのインヒビターの分子毒物学；治験のための代理マーカーの集団および世代の階層化；ならびに、ハイスループットスクリーニング(HTS)における選択的化合物の同定に役立つことによって向上するCD20/IgEレセプター様関連低分子薬物開発。

【0179】

(選択的結合因子)

本明細書で使用される場合、用語「選択的結合因子」とは、1つ以上のCD20/IgEレセプター様ポリペプチド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、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を用いて調製され得る。本発明の例示的なCD20/IgE

Eレセプター様ポリペプチド選択的結合因子は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの特定の部分に結合し得、これによってCD20/IgEレセプター様ポリペプチドレセプターへのこのポリペプチドの結合を阻害する。

【0180】

選択的結合因子(例えば、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに結合する抗体および抗体フラグメント)は、本発明の範囲内にある。抗体は、単一特異性ポリクローナルを含むポリクローナル、モノクローナル(MAbs)、組換え、キメラ、ヒト化(例えば、CDR移植片化)、ヒト、単鎖および/または二重特異性、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。抗体フラグメントは、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のそれらの部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長の抗体の酵素的切断によって生じる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)によって生じるものが挙げられる。

【0181】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに指向するポリクローナル抗体は、動物(例えば、ウサギまたはマウス)において、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドおよびアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって産生される。CD20/IgEレセプター様ポリペプチドが、免疫させるためにその種において免疫原性であるキャリアタンパク質(例えば、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、または大豆トリプシンインヒビター)と結合するのに有用であり得る。また、凝集剤(例えば、ミョウバン)は、免疫応答を増強するために用いられる。免疫後、これらの動物は、飼育され、そしてこの血清を抗CD20/IgEレセプター様ポリペプチド抗体力価についてアッセイする。

【0182】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに指向するモノクローナル抗体は、培養中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の方法を用いて産生

される。モノクローナル抗体を調製するための適切な方法の例としては、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。CD20/IgEレセプター様ポリペプチド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もまた、本発明によって提供される。

【0183】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤としての使用のために改変され得る。1つの実施形態は、特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体において、重鎖および/または軽鎖の一部が対応する配列と同一であるか、または相同であるが、その鎖の残部は、別の種由来の抗体または別の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体において、対応する配列と同一であるかまたは相同である、「キメラ」抗体である。このような抗体のフラグメントもまた、これらのフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、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。

【0184】

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、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源由来の抗体に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野で所望の方法を用いて、実施され得る。(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、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源由来の抗体に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野で公知の方法(

Jonesら, Nature 321:522-525(1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyenら, Science 239:1534-1536(1988))を用いて、ヒト抗体の対応する領域についてのげっ歯類相補性決定領域(CDR)の少なくとも一部分を置換することによって実施され得る。

【0185】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに結合するヒト抗体はまた、本発明に包含される。内因性免疫グロブリン産生の非存在下で、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)を用いて、このような抗体は、必要に応じてキャリアと結合体化される、CD20/IgEレセプター様抗原(すなわち、連続した少なくとも6アミノ酸を有する)での免疫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); Bruggermannら, Year in Immuno., 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、この動物における免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖をコードする内因性遺伝子座を無能力化し、かつそのゲノム中に、ヒト重鎖および軽鎖のタンパク質をコードする遺伝子座を挿入することによって生成される。次いで、部分的に改変された動物(すなわち、全てよりも少ない数の改変)を交雑育種して、所望の免疫系の改変を全て有する動物を得る。免疫原を投与された場合、これらのトランスジェニック動物は、これらの抗原に対して免疫特異性である、ヒト領域を含む可変領域を含む、(例えば、マウスよりもむしろ)ヒトのアミノ酸配列を含む、ヒト可変領域を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT出願番号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およびPCT出願番号PCT/GB89/01207、ならびにEP 546073B1およびEP 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に、宿主細胞における組換えDNAの発現によって

か、またはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。

【0186】

代替の実施形態において、ヒト抗体は、ファージ提示ライブラリーから産生され得る (Hoogenboomら, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); Marksら, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991))。これらは、糸状バクテリオファージの表面上の抗体レパートリーの提示を介した模倣免疫選択、および選りぬきの抗原に対するそれらの結合によるファージの次の選択をプロセスする。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、これは、このようなアプローチを用いた、MPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する高親和性かつ機能的アゴニストの抗体の単離を記載している。

【0187】

キメラ抗体、CDR移植片化抗体、およびヒト化抗体は、組換え方法によって代表的に産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書に記載される材料および手順を用いて発現される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物の宿主細胞(例えば、CHO細胞)において産生される。モノクローナル(例えば、ヒト)抗体は、本明細書において記載されるように、宿主細胞において組換えDNAの発現によってかまたはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。

【0188】

本発明の抗CD20/IgEレセプター様抗体は、以下の任意の公知のアッセイ方法において用いられ得る:例えば、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの検出および定量のための、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、ならびに免疫沈降アッセイ(Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。これらの抗体は、用いられるアッセイ方法に適切な親和性を有するCD20/IgEレセプター様ポリペプチドに結合する。

【0189】

診断適用について、特定の実施形態において、抗CD20/IgEレセプター様抗体は、検出可能な部分で標識され得る。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もののいずれかであり得る。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 、 ^3S 、もしくは ^{125}I ）、蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオロ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（例えば、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（Bayerら, Meth. Enz., 184:138-163 (1990)））であり得る。

【0190】

競合的結合アッセイは、限られた量での抗CD20/IgEレセプター様抗体と結合するために、試験サンプルの分析物（CD20/IgEレセプター様ポリペプチド）と競合する標識された標準物（例えば、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド、またはその免疫学的反応性部分）の能力に依存する。試験サンプル中のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの量は、抗体に結合する標準的な量に反比例する。結合する標準物の量を決定するのを容易にするため、これらの抗体は、競合の前か後に代表的に不溶化され、その結果、これらの抗体に結合された標準物および分析物は、結合されていないままの標準物および分析物から、慣用的に分離され得る。

【0191】

サンドイッチアッセイは、代表的に、検出および/または定量されるタンパク質の2つの抗体（異なる免疫原性部分、またはエピトープにそれぞれ結合し得る）の使用を含む。サンドイッチアッセイにおいて、試験サンプルの分析物は、代表的に、固体支持体上に固定化される第1抗体に結合し、その後、第2の抗体がこの分析物に結合し、したがって、不溶性の3つの部分の複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体に検出可能な部分を標識してもよいし（直接的サンドイッチアッセイ）、検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接的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、固相酵素

免疫アッセイ (E L I S A) であり、この場合、検出可能な部分は、酵素である。

【 0 1 9 2 】

選択的結合因子 (抗 C D 2 0 / I g E レセプター様抗体を含む) はまた、インビボでのイメージングに有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物に、好ましくは、血流中に投与され得、そして宿主における標識された抗体の存在および位置が、アッセイされる。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、動物において検出可能な任意の部分で標識され得る。

【 0 1 9 3 】

本発明の選択的結合因子 (抗体を含む) は、治療剤として用いられ得る。これらの治療剤は、一般に、以下の点において、アゴニストまたはアンタゴニストである：これらのいずれかが、C D 2 0 / I g E レセプター様ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ、増強するかまたは減少させる。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、C D 2 0 / I g E レセプター様ポリペプチドに特異的に結合し得、そして、インビボまたはインビトロにおいてC D 2 0 / I g E レセプター様ポリペプチドの機能的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、選択的結合因子 (例えば、アンタゴニスト抗体) は、少なくとも約50%まで、そして好ましくは、少なくとも約80%まで、C D 2 0 / I g E レセプター様ポリペプチドの機能的活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、C D 2 0 / I g E レセプター様結合パートナー (リガンドまたはレセプター) と相互作用し得、これによって、インビボまたはインビトロにおいてC D 2 0 / I g E レセプター様活性を阻害または排除する抗体であり得る。選択的結合因子 (アゴニストおよびアンタゴニスト抗 C D 2 0 / I g E レセプター様抗体を含む) は、当該分野で周知のスクリーニングアッセイによって同定される。

【 0 1 9 4 】

本発明はまた、C D 2 0 / I g E レセプター様選択的結合因子 (例えば、抗体) および生物学的サンプルにおいてC D 2 0 / I g E レセプター様ポリペプチド

のレベルを検出するのに有用な他の試薬を備えるキットに関する。このような試薬は、検出可能な標識、ブロッキング血清、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬を含み得る。

【0195】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドは、「発現クローニング」ストラテジーを用いてCD20/IgEレセプター様リガンドをクローニングするために使用され得る。放射線標識(125-ヨウ素)CD20/IgEレセプター様ポリペプチドまたは「親和性/活性-タグ化」CD20/IgEレセプター様ポリペプチド(例えば、Fc融合またはアルカリホスファターゼ融合)を結合アッセイに用いて、CD20/IgEレセプター様リガンドを発現する細胞型または細胞株または組織を同定し得る。次いで、このような細胞または組織から単離されたRNAは、cDNAに変換され、そして哺乳動物細胞(例えば、COS、または293)中にトランスフェクトされて、発現ライブラリーを生成し得る。次いで、放射線標識されたかまたはタグ化されたCD20/IgEレセプター様ポリペプチドを親和性試薬として用いて、CD20/IgEレセプター様リガンドを発現するこのライブラリーにおける細胞のサブセットを同定し、そして単離し得る。次いで、DNAは、これらの細胞から単離され、哺乳細胞中にトランスフェクトされて、CD20/IgEレセプター様リガンドを発現する細胞の画分が、もとのライブラリーにおける発現よりも何倍も高い2次発現ライブラリーを生成する。この富化プロセスは、CD20/IgEレセプター様リガンドを含む単一組換えクローンが単離されるまで、何度も反復され得る。CD20/IgEレセプター様リガンドの単離は、CD20/IgEレセプター様シグナル伝達経路の新規のアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するのに有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、CD20/IgEレセプター様リガンド、抗CD20/IgEレセプター様リガンド抗体、低分子、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0196】

(CD20/IgEレセプター様ポリペプチド活性の他のモジュレーターについてのアッセイ)

いくつかの状況において、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの活性のモジュレーターである分子（すなわち、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。CD20/IgEレセプター様ポリペプチドを調節する天然の分子または合成分子は、1つ以上のスクリーニングアッセイ（例えば、本明細書において記載されるアッセイ）を用いて同定され得る。このような分子はまた、エキソビボ様式、または注射によるインビボ様式、または経口送達、移植装置などのいずれかによって投与され得る。

【0197】

「試験分子」とは、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの活性を調節（すなわち、増加または減少）する能力についての評価下にある分子をいう。通常、試験分子は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまた、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド活性を（例えば、CD20/IgEレセプター様遺伝子発現に影響することによってか、またはCD20/IgEレセプター様結合パートナー（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）間接的に調節し得ることも考慮される。1つの実施形態において、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、そしてなおより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数で、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドと結合する。

【0198】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチド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、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドは、試験分子とCD20/IgEレセプター様ポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で試験分子ととも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得る。試験分子は、実質的に精製された形態においてかまたは粗混合物においてスクリーニングされ得る。

【0199】

特定の実施形態において、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、CD20/IgEレセプター様ポリペプチド、ま

たはそのリガンドと相互作用し、その活性を調節するタンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得る。CD20/IgEレセプター様ポリペプチド発現を調節する分子は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドをコードする核酸に相補的であるか、またはCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの発現を指向するかまたは制御する核酸配列に相補的である核酸を含み、そしてこれらの核酸は、発現のアンチセンス調節因子として作用する。

【0200】

一旦、CD/IgE-レセプター様ポリペプチドと相互作用する場合に、試験化合物が、同定されると、この分子は、CD/IgE-レセプター様ポリペプチド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CD/IgE-レセプター様ポリペプチド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、CD/IgE-レセプター様ポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてCD/IgE-レセプター様ポリペプチド活性が、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。

【0201】

試験分子とCD/IgE-レセプター様ポリペプチド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CD/IgE-レセプター様ポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0202】

CD/IgE-レセプター様ポリペプチドが、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CD/IgE-レセプター様ポリペプチド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CD/IgE-レセプター様ポリペプチド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ために、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、CD/IgE-レセプター様ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に免疫化される。次いで、放射標識したCD/IgE-レセプター様ポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したCD/IgE-レセプター様ポリペプチド結合パートナー）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）または同時に添加され得る。インキュベーション後に、この壁を洗浄し、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、結合パートナーがCD/IgE-レセプター様ポリペプチドに結合する範囲を決定する。代表的に、分子は、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CD/IgE-レセプター様ポリペプチド結合パートナーを免疫化し、試験分子および放射標識したCD/IgE-レセプター様ポリペプチドをインキュベートし、そしてCD/IgE-レセプター様ポリペプチド結合の範囲を決定する工程）を包含する。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第18章（Ausubelら編、Green Publishers Inc.ならびにWileyおよびSons 1995）を参照のこと。

【0203】

放射性標識に対する代替として、CD/IgE-レセプター様ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、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。CD/IgE-レセプター様ポリペプチドまたはCD/IgE-レセプター様ポリペプチド結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体はまた、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複合体のインキュベーションに続い

て、検出の目的のために使用され得る。

【0204】

CD / IgE - レセプター様ポリペプチドまたはCD / IgE - レセプター様ポリペプチド結合パートナーは、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体相基材への付着によって固定化され得る。基材 - タンパク質複合体は、相補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澱され得、そしてCD / IgE - レセプター様ポリペプチド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、カラムを通過する、試験分子および相補タンパク質を用いてカラム内に固定化され得る。CD / IgE - レセプター様ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、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。

【0205】

CD / IgE - レセプター様ポリペプチド結合タンパク質とCD / IgE - レセプター様ポリペプチド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、CD / IgE - レセプター様ポリペプチドまたはCD / IgE - レセプター様ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（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。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側面に物理的に関係する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0206】

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、CD/IGE - レセプター様ポリペプチドとCD/IGE - レセプター様ポリペプチド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。

【0207】

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、CD/IGE - レセプター様ポリペプチドとCD/IGE - レセプター様ポリペプチド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。

【0208】

CD/IGE - レセプター様ポリペプチドとCD/IGE - レセプター様ポリペプチド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、CD/IGE - レセプター様ポリペプチドまたはCD/IGE - レセプター様ポリペプチド結合パートナーFのいずれかを発現する細胞および細胞システムを使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞システムは、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、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。CD/IGE - レセプター様ポリペプチドの、CD/IGE - レセプター様ポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験化合物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、CD/IGE - レセプター様ポリペプチド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。

【0209】

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、CD/IgE-レセプター様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CD/IgE-レセプター様ポリペプチドまたはCD/IgE-レセプター様ポリペプチドフラグメントの量は、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、細胞培養物への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、細胞培養物への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生じ得るか、またはそれらと関連し得る。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。

【0210】

酵母2ハイブリッド系(Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:9578~9583(1991))を使用して、CD/IgE-レセプター様ポリペプチドに結合するかまたは相互作用する、新規なポリペプチドを同定し得る。例として、酵母GAL4-DNA結合ドメインと融合するCD/IgE-レセプター様ポリペプチドの細胞質ドメインをコードするDNAを含むハイブリッド構築物は、2ハイブリッドおとり(bait)プラスミドとして使用され得る。スクリーニングから出現する陽性クローンは特徴付けられ、さらに相互作用タンパク質を同定し得る。

【0211】

(内部移行タンパク質)

tatタンパク質配列(HIV由来)が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、Falwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸の配列(YGRKKRRQRR

R ; 配列番号 24) (「タンパク質形質導入ドメイン」、または TAT PDT と称される) は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarze ら , 1999 , Science 285 : 1569 - 72 ; および Nagahara ら , 1998 , Nat . Med . 4 : 1449 - 52 を参照のこと。これらの手順において、FITC 構築物 (FITC - GGGYGRKKRRQRRR ; 配列番号 25) (これは、腹腔内投与に続いて組織を貫通する) が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光細胞分析分離 (FACS) 分析によって検出される。tat - gal 融合タンパク質で処置された細胞は、gal 活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織 (肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織) において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入に続いて、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0212】

従って、tat タンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、tat タンパク質配列を使用して、CD / IgE - レセプター様アンタゴニスト (例えば、抗 CD / IgE - レセプター様選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド) は、CD / IgE - レセプター様分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「CD / IgE - レセプター様分子」は、本明細書中に記載されるような、CD / IgE - レセプター様核酸分子および CD / IgE - レセプター様ポリペプチドの両方をいう。所望ならば、CD / IgE - レセプター様タンパク質自体はまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus , 1999 , Science 285 : 1466 - 67 をまた参照のこと。

【0213】

(CD / IgE - レセプター様ポリペプチドを使用する細胞供給源の同定)

本発明の特定の実施形態に従って、CD / IgE - レセプター様ポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定することを可能することが有用であり得

る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定に実施形態において、CD/IgE-レセプター様ポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗CD/IgE-レセプター様ポリペプチド抗体を使用して、細胞におけるCD/IgE-レセプター様ポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞か否かを決定し得る。

【0214】

(治療的使用)

本発明のCD/IgE-レセプター様核酸、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストで処置、診断、寛解または予防され得る、急性および慢性疾患の非排他的なリストには、以下が挙げられる：

- ・癌（肺癌、脳癌、乳癌、造血系の癌、前立腺癌、卵巣癌、および精巣癌が挙げられるがこれらに限定されない）。他の癌もまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0215】

- ・異常な細胞増殖に関する疾患（動脈硬化症および血管再狭窄が挙げられるが、これらに限定されない）。細胞の不適切な増殖によって影響される他の疾患もまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0216】

- ・アレルギーに対する不適切な応答から生じる病理。このような疾患の例としては、アレルギー、喘息、皮膚炎、およびアナフィラキシーショックが挙げられるが、これらに限定されない。アレルギー応答の機能不全によって影響される他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。

【0217】

- ・免疫系の機能不全に関連する疾患および状態（慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎、炎症性関節炎、変形性関節症、炎症性関節疾患、自己免疫疾患、多発性硬化症、狼瘡、糖尿病、炎症性腸疾患、移植片拒絶、および対宿主性移植片病が挙

げられるが、これらに限定されない)。免疫系の機能不全によって影響される他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。

【0218】

・生殖性疾患および障害(不妊、流産、早期分娩(labor)および出産(delivery)、ならびに子宮内膜症が挙げられるがこれらに限定されない)。生殖系の他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。

【0219】

提示されるCD/IgE-レセプター様ポリペプチドの望ましくないレベルに関係する他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。望ましくないレベルにはこれらのポリペプチドの、過剰なレベルおよび/または正常以下のレベルが挙げられる。

【0220】

(CD/IgE-レセプター様ポリペプチド組成物および投与)

治療組成物は、本発明の範囲内である。このようなCD/IgE-レセプター様ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量のCD/IgE-レセプター様ポリペプチドまたはCD/IgE-レセプター様核酸分子を、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CD/IgE-レセプター様ポリペプチド選択的結合因子を、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。

【0221】

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。

【0222】

薬学的組成物は、例えば、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、解離もしくは放出の速度、吸着、または透過を改変、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 (sodium hydrogen - sulfite))、緩衝液 (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)、バルク剤 (例えば、マンニトールまたはグリシン)、キレート化剤 (例えば、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)、増量剤、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、芳香剤および希釈剤、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、塩化ベンズアルコニウム、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、ポリソルベート20またはポリソルベート80) ; トリトン ; トロメタミン ; レシチン ; コlesteroールまたはチロキサポール (tyloxapal))、安定性増強剤 (例えば、スクロースまたはソルビトール)、張度増強剤 (例えば、ハロゲン化アルカリ金属 (好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム)、またはマンニトール、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を参照のこと。

【0223】

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、CD / IgE - レセプター様分子の、物理的な状態、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。

【0224】

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、自然状態では、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり得、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得る。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pH 7.0 ~ 8.5のTris緩衝液または約pH 4.0 ~ 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、CD / IgE - レセプター様ポリペプチド組成物は、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、CD / IgE - レセプター様ポリペプチド産物は、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。

【0225】

このCD / IgE - レセプター様ポリペプチドの薬学的組成物は、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) 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、当該分野の技術の範囲内にある。

【0226】

処方成分が、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたはわずかにより低いpH (典型的に、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。

【0227】

非経口投与が意図される場合、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CD / IgE - レセプター様分子を含む、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、ここで、CD / I g E - レセプター様分子は、滅菌の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製は、所望の分子と、薬剤（例えば、注入可能なマイクロスフェア、生体内腐食可能（*bio-erodible*）粒子、ポリマー化合物（例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソーム）との処方物に関し得、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御放出または持続放出を提供する。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環における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。

【0228】

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、CD / I g E - レセプター様ポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。CD / I g E - レセプター様ポリペプチドまたは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剤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WO94/20069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。

【0229】

特定の処方物が、経口投与され得ることもまた意図される。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CD / I g E - レセプター様ポリペプチドが、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、そして前全身的分解（*pre-systemic degradation*）が最小化される場合に胃腸管内の時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、CD / I g E - レセプター様ポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、芳香剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた使用され得る。

【0230】

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CD/IGE-レセプター様ポリペプチドを含み得る。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（例えば、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、ゼラチンまたはアカシア）；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）。

【0231】

さらなるCD/IGE-レセプター様ポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続送達処方物または制御送達処方物中にCD/IGE-レセプター様ポリペプチドを含む処方物を含む。種々の他の持続送達手段または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体内腐食可能な微粒子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微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クスを含む。徐放性マトリクスとしては、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（Langerら, 前出）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）が挙げられ得る。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036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

【0232】

インビボ投与のために使用されるCD/IgE-レセプター様の薬学的組成物は、代表的に無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築の前または後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。

【0233】

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（凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

【0234】

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。

【0235】

治療的に使用されるCD20/IgE-レセプター様の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、CD20/IgE-レセプター様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 (t i t e r)、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。

【0236】

投薬の頻度は、使用される処方物中での CD20 / I g E - レセプター様分子の薬物動態学の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。組成物は、従って、組成物は、経時的な単一用量として、2以上の用量（これは、同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、そしてそれらによって慣用的に実施される課題の範囲内である。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。

【0237】

薬学的組成物の投与の経路は、以下のような公知の方法と一致する：経口的に；静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介して；徐放性系によって；または移植デバイスによって。所望される場合、これらの組成物は、ボー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。

【0238】

あるいはまたはさらに、組成物は、その上に所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される膜、スポンジ、または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、時限放出ボーラスまたは連続的な投与を介し得る。

【0239】

いくつかの場合において、エキソビボ様式において、CD20/IgE-レセプター様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、患者から除去された細胞、組織、または器官は、これらの細胞、組織、および/または器官が引き続いて患者に移植し戻された後にCD20/IgE-レセプター様薬学的組成物に曝露される。

【0240】

他の場合において、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、遺伝的に操作されて、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド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、動物細胞またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。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ために、カプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性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、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子によって細胞の破壊を防止する。

【0241】

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、通常は転写に対してサイレントなCD20/IgE-レセプター様遺伝子（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CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

【0242】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である。Kucherlapati, 1989, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36:301。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノム

の特定の領域に導入するため(Thomasら、1986, Cell 44:419-28; ThomasおよびCapecchi, 1987, Cell 51:503-512; Doetschmanら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8583-87)、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため(Doetschmanら、1987, Nature 330:576-578)の方法として、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(欧州特許第9193051号、同第505500号; PCT/US90/07642、PCT公開番号WO 91/09955)に記載されている。

【0243】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的DNAに付着させることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的(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対して相補的な標的DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズしたDNAの一般的な特性であり、そして従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換わる。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付着される場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

【0244】

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域(例えば、隣接配列)が、標的DNAのこれらの断片に付着する。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、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドをコードするDNAの近位に、このDNAの転写に影響を与えるに十分な配向で、挿入される。制御エレメントは

、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの部分を制御する。従って、所望のCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの発現は、CD20/IgE-レセプター様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、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的DNA（目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む）の使用によって、達成され得る。

【0245】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、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の導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットの産生を実際に生じるような様式で、染色体（ゲノム）DNAに導入される（ここで、DNA構築物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は、内因性遺伝子に作動可能に連結する）。染色体DNAへのこれらの構成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化する。

【0246】

本明細書中で記載されるように、変化された遺伝子発現は、通常は得られたままの細胞においてサイレントな（発現されていない）遺伝子の活性化（または発現させる）、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたままの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り、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少（排除を含む）させる。

【0247】

細胞の内在性CD20/IgE-レセプター様遺伝子からのCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同定組換えが使用され得る1つの方法は、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列（例えば、Cre/LoxP、FLP/F

RT) (Sauer, 1994, *Current Opinion Biotechnology*, 5: 521-527; Sauer, 1993, *Methods Enzymology*, 225: 890-900) を、細胞の内在性ゲノムCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドコード領域の上流(すなわち、5')に配置する工程を包含する。ゲノムCD20/IgE-レセプター様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対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノムCD20/IgE-レセプター様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み得る(BaubonisおよびSauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21: 2025-2029; O'Gormanら, 1991, *Science* 251: 1351-1355)。転写を増加させることが知られている任意の側方配列(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、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性CD20/IgE-レセプター様遺伝子からの新たなまたは増加したCD20/IgE-レセプター様ポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で一体化する。

【0248】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノムCD20/IgE-レセプター様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さらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入するために相同性組換えを使用することである。適切な組換え酵素は、次いで、二組換え部位細胞株に導入され、組換え現象(欠失、転化、および転移)を生じ(Sauer, 1994, *Current Opinion Biotechnology*, ; Sauer, 1993, *Methods Enzymology*,)、これは、細胞の内在性CD20/IgE-レセプター様遺伝子からの新規なまたは増加したCD20/IgE-レセプター様ポリペプチド産生を生じる新しいかまたは改変された転写ユニットを作製する。

【0249】

細胞の内在性CD20/IgE-レセプター様遺伝子からのCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性CD20/IgE-レセプター様遺伝子からの新たなまたは増加したCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加するかまたは引き起こし、そして/または遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサ）の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に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、細胞の内在性CD20/IgE-レセプター様遺伝子からの新たなまたは増加したCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【0250】

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、代表的なDNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）制御配列、（c）エクソン、および（d）不对スプライスドナー部位。DNA構築物中の標的配列は、エレメント（a）～（d）の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（d）は、内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、DNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）制御配列、（c）エクソン、（d）スプライスドナー部位、（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、標的配列は、エレメント（a）～（f）の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（f）は、内在性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体DNAの予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エクソンは、一般的に、制御配列の3'であり、そしてスプライスドナー部位は、このエクソンの3'である。

【0251】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中で記載されるCD20/IgE-レ

セプター様ポリペプチドの核酸配列)が公知である場合、遺伝子の選択された領域に対して相補的なDNAの部分は、合成されるか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブのDNAの適切な制限等によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入された際に、標的配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に生じる場合、このDNAの部分、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、Okazakiフラグメントとして作用し、そしてDNAの新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的配列として使用され得る。

【0252】

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチド細胞治療(例えば、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを産生する細胞の移植)もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このようなCD20/IgE-レセプター様ポリペプチド産生細胞は、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの天然産物である細胞であり得るか、または組換え細胞であって、そのCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを産生する能力が、所望のCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドをコードする遺伝子またはCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、その発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを投与されている患者における強力な免疫学的反応を最小化するために、異種のポリペプチドの投与と共に生じる場合、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトCD20/IgE-レセプター様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。

【0253】

移植細胞は、周辺組織の浸透を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）の形態で患者に移植され得る。あるいは、CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドをエキソビボで産生するように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で、患者に直接移植され得る。

【0254】

生きた細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgeら(WO95/05452およびPCT/US94/09299)は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に取り出し可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボで下方制御に供されない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する。このデバイスは、生きた細胞由来の分子のレシピエント内の特定の部位への送達を提供する。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。生きた細胞をカプセル化するためのシステムは、PCT/US91/00157(Aebischerら)に記載される。PCT公開番号91/00155(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。

【0255】

CD20/IgE-レセプター様ポリペプチドのインビボおよびインビトロの

遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘発性プロモーターに作動可能に連結され得るCD20/IgE-レセプター様ポリペプチドをコードするCD20/IgE-レセプター様遺伝子(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、内在性CD20/IgE-レセプター様遺伝子に対してホモ接合性またはヘテロ接合性であり得るが、ただし、これは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されるDNA分子(例えば、相同性組換えのために有用な内在性配列)、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を越える選択的優性を提供し得る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、細胞標的化について)、細胞特異的内部移行、ベクターからの発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含む。

【0256】

遺伝子治療DNA構築物は、次いで、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導入され得る(エキソビボまたはインビボ/いずれか)。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの方法は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターの使用による。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、細胞質に残る。

【0257】

さらに他の実施形態において、制御エレメントが、標的細胞におけるCD20/IgE-レセプター様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応答して刺激される。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来制御手段は、低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タンパク質)を二

量化する低分子二量化剤またはラパログ (rapalog) の使用を包含する (WO9641865 (PCT/US97/099486)、WO97/31898 (PCT/US96/03137) およびWO97/31899 (PCT/US95/03157) を参照のこと)。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0258】

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、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、内在性小網における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物 (例えば、低分子リガンド) を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。Science 287:816-817 および 287:826-830 (2000) を参照のこと。

【0259】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中で記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。Mifepristone (RU486) は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。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プロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子のダイマーを形成することによって、転写を活性化し、次いで、核に至り、DNAに結合する。このリガンド結合ドメインは、天然のリガンドに結合するレセプターの能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5,364,791号、ならびにWO9640911およびWO9710337に記載される。

【0260】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター (細胞質レセプター) に結合し、そしてこれを活性化するエクジソン (ショウジョウバエステロイドホルモン) を使用する。次いで、このレセプターは核に転移し、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)に結合する。エクジソンレセプターは、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、およびリガンド結合ドメインを含み、転写を開始する。エクジソン系はさらに、米国特許第5,514,578、およびPCT公開WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162に記載される。

【0261】

別の制御手段は、陽性テトラシクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異したtetレプレッサタンパク質DNA結合ドメイン(逆テトラサイクリン制御トランス活性化因子タンパク質を生じた変異したtetR-4アミノ酸の変化、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号に記載される。

【0262】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号(Innovir Laboratories Inc.)に記載される。

【0263】

インビボの遺伝子治療は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドをコードする遺伝子を、CD20/IgEレセプター様核酸分子の局所的な注射を介して、または他の適切なウイルス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って達成され得る。Hef ti、Neurobiology、25:1418-1435(1994)。例えば、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター中に含まれ得る(例えば、Johnson、国際公開番号WO95/34670;国際出願番号PCT/US95/07178)。組換えAAVゲノムは、代表的には、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したCD20/IgEレセプター様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。

【0264】

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、アデノウイルス、単純疱疹ウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、およびパピローマウイルスの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トロの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、治療的タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するためにインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、治療的タンパク質を患者に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行のためのさらなる方法および材料は、アデノウイルスベクターに関する米国特許第5,631,236号；レトロウイルスベクターに関する米国特許第5,672,510号；およびサイトカインを発現するレトロウイルスベクターに関する米国特許第5,635,399号に記載される。

【0265】

非ウイルス送達方法は、リポソーム媒介移入、裸のDNAの送達（直接注射）、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、親細胞を超えて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（安全な測定）、細胞特異的結合剤（細胞標的化のための）、細胞特異的内在化因子、ならびにベクターによる発現を増強する転写因子の使用、そしてベクター製造のための方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実行のためのこのようなさらなる方法および材料は、エレクトロポレーション技術に関する米国特許第4,970,154号；核リガンドに関するWO96/40958；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5,679,559号；リポソームキャリアに関する米国特許第5,679,954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に関する米国特許第5,593,875号;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、ある速度で細胞に噴射され、それによってこの粒子は細胞の表面を貫通し、そして細胞内部に取り込まれる)に記載される。

【0266】

CD20/IgEレセプター様遺伝子治療または細胞治療はさらに、同じ細胞または異なる細胞において1以上のさらなるポリペプチドの送達を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、上記のようなカプセル化膜)中に含まれ得るか、またはこれらの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0267】

遺伝子治療を介して、細胞における内在性のCD20/IgEレセプター様ポリペプチド発現を増大させる手段は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドプロモーター中に1以上のエンハンサーエレメントを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、CD20/IgEレセプター様遺伝子の転写活性を増大するように作用し得る。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の活性化を与えることが公知のエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、CD20/IgEレセプター様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、Ick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、添加されるべき転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメント中に挿入され得る(そして必要に応じて、ベクターならびに/または5'隣接配列および/もしくは3'隣接配列などの中に挿入される)。次いで、「相同組換え構築物」として公知のこの構築物は、エキソビボまたはインビボのいずれかで所望の細胞に導入され得る。

【0268】

遺伝子治療はまた、内在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CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの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、代表的には、相同組換え方法を介して達成される。例えば、不活化のために選択されたCD20/IgEレセプター様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の断片を除去および/または置換するように操作され得る。例えば、TATAボックスおよび/またはプロモーターの転写活性化因子の結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得る；このような欠失は、プロモーターの活性を阻害し得、それによって対応するCD20/IgEレセプター様遺伝子の転写を抑制する。TATAボックスまたはプロモーターの転写活性化因子結合部位の欠失は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドプロモーター（調節されるべきCD20/IgEレセプター様遺伝子と同種または関連の種由来の）の全てまたは関連部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、TATAボックスおよび/または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドの1以上は、1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。結果として、TATAボックスおよび/または活性化因子結合部位は、活性を減少させるかまたは完全に不活化される。この構築物は、代表的には、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（内在性の）5'および3' DNA配列に対応するDNAの少なくとも約500塩基を含む。この構築物は、適切な細胞中に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）、直接または本明細書中に記載のウイルスベクターを介してかのいずれかで導入され得る。代表的には、細胞のゲノムDNAへの構築物の組み込みは、相同組換えを介してであり、ここで、プロモーター構築物の5'および3' DNA配列は、内在性の染色体DNAに対するハイブリダイゼーションを介して改変されたプロモーター領域を組み込む際の補助として役立ち得る。

【0269】

（CD20/IgEレセプター様核酸およびポリペプチドのさらなる使用）

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）は、CD20/IgEレセプター様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するために使用され得る。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）によってなされ得る。

【0270】

CD20/IgEレセプター様核酸分子（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、定量的または定性的にのいずれかで、哺乳動物の組織または体液サンプルにおけるCD20/IgEレセプター様DNAまたは対応するRNAの存在について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。

【0271】

CD20/IgEレセプター様ポリペプチドは、（同時にまたは引き続いて）サイトカイン、増殖因子、抗体、抗炎症剤、および/または化学療法剤（処置される兆候に適切な場合）の1つ以上と組み合わせて使用され得る。

【0272】

1以上のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合、他の方法もまた使用され得る。このような阻害は、発現制御配列（三重らせん形成）またはCD20/IgEレセプター様mRNAに相補的でありかつ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CD20/IgEレセプター様遺伝子の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するアンチセンスDNAまたはRNA分子は、細胞に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの配列を使用する利用可能な技術によって設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、各々の選択されたCD20/IgEレセプター様遺伝子の開始部位（5'末端）に相補的である。次いで、このアンチセンス分子が、対応するCD20/IgEレセプター様mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳は阻止されるかまたは減少される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物体におけるCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの減少または非存在に関する情報を提供する。

【0273】

あるいは、遺伝子治療は、1以上のCD20/IgEレセプター様ポリペプチドのドミナントネガティブな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、各々の選択されたCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするDNAが調製され得、本明細書中に記載のウイルスまたは非ウイルス方法のいずれかを使用して患者の細胞に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的には、その生物学的な役割において内在性のポリペプチドと競合するように設計される。

【0274】

さらに、生物学的に活性か否かにかかわらず、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドは、免疫原、すなわち、抗体を惹起し得る少なくとも1つのエピトープを含むポリペプチドとして使用され得る。CD20/IgEレセプター様ポリペプチド(本明細書中に記載のような)に結合する選択的結合剤は、インビボおよびインビトロの診断目的のために使用され得、体液または細胞サンプル中でCD20/IgEレセプター様ポリペプチドの存在を検出するための標識形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体はまた、本明細書中で列挙したもの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。これらの抗体は、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに特徴的な活性の少なくとも1つを減少させるかまたはブロックするように、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに結合し得るか、あるいは、CD20/IgEレセプター様ポリペプチドに特徴的な活性の少なくとも1つを増大するために(CD20/IgEレセプター様ポリペプチドの薬物動態を増大させることによるものを含む)ポリペプチドに結合し得る。

【0275】

以下の実施例は、本発明の性質をさらに代表するために役立つが、添付の特許請求の範囲によってのみ規定される本発明の範囲を限定するものであると解釈されるべきではない。

【0276】

(実施例1)

(CD20/IgEレセプター様cDNA(AGP-69406-a1)のク

ローニング)

a g p - 6 9 4 0 6 - a 1 (C D 2 0 R P 1) を、A m g e n で単離したマウス遺伝子 (a g p - 6 5 2 2 0 - a 1) に対する相同性に基づいて同定した。公共のデータベースの、相同性ベースのB L A S T検索は、翻訳に際してヒトI g E R / E C R Iに対する相同性を示す4 2 8 n tのDNAフラグメント (s m b r 7 - 0 0 0 4 4 - b 9 - a) を同定した。この相同性に基づき、s m b r 7 - 0 0 0 4 4 - b 9挿入物の全体を配列決定した。s m b r 7ライブラリーを、以下のように構築した：総RNAを、オステオプロテゲリン (o s t e o p r o t e g e r i n) (P O G) ノックアウトマウス由来の破砕した大腿骨および脛骨から、標準的なRNA抽出手順を使用して抽出し、そしてポリ - A⁺ RNAを、当業者に公知の標準的な手順を使用して、この総RNAから選択した。ランダムプライムされたかまたはオリゴ (d T) プライムされたc DNAを、このポリ - A⁺ RNAから、c DNA合成のためのS u p e r s c r i p t P l a s m i d S y s t e mの手引き書中の手順およびP l a s m i d C l o n i n g キット (G i b c o - B R L , I n c . , R o c k v i l l e , M D) を使用して、または当業者に公知の他の適切な手順を使用して、合成した。得られたc DNAを、適切な制限酵素で消化して、クローニングベクターへの連結を補助する粘着末端を生成した。この消化されたc DNAを、適切な制限酵素を用いて予め消化したp S P O R T 1クローニングベクターまたは当業者に公知の別の適切なクローニングベクター中に連結した。この連結産物を、当該分野で公知の標準的な技術を使用してE . c o l i 中に形質転換し、そして形質転換体を、使用される特定のクローニングベクターに依存して、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシンまたはクロラムフェニコールのいずれかを含む細菌培地プレート上で選択した。c DNAライブラリーは、これらの形質転換体の全てまたは下位集団からなる。s m b r 7 - 0 0 0 4 4 - b 9配列を使用するA m g e n e s i s および公開データベースの相同性ベースの検索は、事実上の連続配列a h g i 1 - 0 3 0 8 5 3 - c y aを構築することが可能ないくつかの関連ヒトDNAフラグメントを同定した。この配列に基づくコード領域を単離するための試みは、複数のバンドを得、そして5' および3' R A C Eを使用して、実際のコード領域

を単離した。両方のRACE反応のために、ヒト骨格筋Marathon cDNA (Clontech、Palo Alto、CA)をテンプレートとして使用した。5' RACEについて、第一回の反応は、プライマー2277-69 (5' - CAG CCC GTT CTG CAG GTA ATC TTC - 3'、配列番号5)およびAP1 (5' - CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC - 3'、配列番号6、Clontech)を、25 μ lの反応容積中の0.2 ngのテンプレートDNA、0.2 μ Mの最終各プライマー、0.2 mMの最終濃度のヌクレオチド、および0.5 μ lのAdvantage cDNAポリメラーゼ混合物 (Clontech)と共に使用した。PCR後、この第一回の反応物を、1:50に希釈し、そして5 μ lを50 μ lの最終反応容積中で使用した。この反応物は、ヌクレオチドの最終濃度0.2 mM、最終各プライマー0.2 μ MおよびAdvantage cDNAポリメラーゼ混合物1 μ lを有した。第二回の反応に使用したプライマーは、2277-70 (5' - ATG TGT CCA GGT TTC TCT CT T TGA G - 3'、配列番号7)およびAP2 (5' - ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC - 3'、配列番号8、Clontech)であった。3' RACEは、同じ反応条件を使用して、第一回の反応のために、異なるプライマーセット2277-72 (5' - TTA CTG CAG GAG CAG GCC TCT TC - 3'、配列番号9)およびAP1を用い、一方、第二回の反応においてはプライマーセット2277-73 (5' - CAG CAT GGT AGC CCT GAG GAC TG - 3'、配列番号10)およびAP2プライマーを使用した。両方の第一回の反応のためのPCR条件は、94 $^{\circ}$ Cで2分、次いで5サイクル(94 $^{\circ}$ Cで10秒、72 $^{\circ}$ Cで2分)、次いで5サイクル(94 $^{\circ}$ Cで10秒、70 $^{\circ}$ Cで2分)、次いでさらなる25サイクル(94 $^{\circ}$ Cで10秒、68 $^{\circ}$ Cで2分)からなる。両方の第二回の反応のためのPCR条件は、第二回においては最後のサイクル条件が25サイクルの代わりに15サイクルで実施されたという点を除いて、第一回の条件と同じであった。RACE産物の配列決定後、オープンリーディングフレーム(ORF)全体を増幅するためにプライマーを設計することが可能である。プライマーセット2

289-28(5'-CAA CAC GTC GAC CCA CCA TG
C TAT TAC AAT CCC AAA CCA TGG G-3'、配
列番号11)および2289-29(5'-CAA CAA GCG GCC
GCA GTT GCT TTT CCT TCC TCT GAG GC-3
'、配列番号12)を、ヒト骨格筋marathon cDNA上で使用して、
上記のRACEの第一回について記載された条件と同じPCR条件を使用してO
RF全体を増幅した。増幅PCR産物を、適切な制限酵素で消化して、pSPO
RTプラスミド(Life Science Technology)中にサブ
クローニングした。

【0277】

(実施例2)

(CD20/IgEレセプター様cDNA(AGP-96614-a1)のク
ローニング)

agp-96614-a1(CD20RP2)を、Amgenで単離された4
01ntのマウス配列(ymmn1-00775-h7-a)で開始するコンピ
ューター分析によって作成されたコンティグに対する相同性に基づいて最初に同
定した。このymmn1ライブラリーを、以下のように構築した：総RNAを、
標準的なRNA抽出手順を使用して複数のマウス組織から抽出してプールし、そ
して当業者に公知の標準的な手順を使用して、ポリ-A⁺RNAをこの総RNA
から選択した。ランダムプライムまたはオリゴ(dT)プライムされたcDNA
を、このポリ-A⁺RNAから、cDNA合成のためのSuperscript
Plasmid Systemの手引き書中の手順およびPlasmid C
loningキット(Gibco-BRL, Inc., Rockville, M
D)を使用して、または当業者に公知の他の適切な手順を使用して、合成した。
得られたcDNAを、適切な制限酵素で消化して、クローニングベクターへの連
結を補助する粘着末端を生成した。この消化されたcDNAを、適切な制限酵素
によって予め消化したpSPORT1クローニングベクターまたは当業者に公知
の別の適切なクローニングベクター中に連結した。この連結産物を、当該分野で
公知の標準的な技術を使用してE. coli中に形質転換し、そして形質転換体

を使用される特定のクローニングベクターに依存して、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシンまたはクロラムフェニコールのいずれかを含む細菌培地プレート上で選択した。cDNAライブラリーは、これらの形質転換体の全てまたは下位集団からなる。公開データベースの相同性ベースのBLAST検索は、翻訳に際してヒトIgER/FCRIに対する相同性を示す691ntのDNAフラグメント(a h g i - 0 9 8 6 9 6 - c y a 1)を同定した。このフラグメントは、コード領域全体を含んだようであったが、5'および3'RACEを使用して、実際の正確なORFを同定した。両方のRACE反応について、ヒト精巢Marathon cDNA(Clontech、Palo Alto、CA)を、テンプレートとして使用した。5'RACEのために、第一回の反応は、プライマー2277-19(GGA AGA TAA CTC CAA AAG AAA AGG TC-3'、配列番号13)およびAP1(上記を参照のこと)を、25µlの反応容積中の0.2ngのテンプレートDNA、0.2µMの最終各プライマー、0.2mMの最終濃度のヌクレオチド、および0.5µlのAdvantage cDNAポリメラーゼ混合物(Clontech)と共に使用した。PCR後、この第一回の反応物を、1:50に希釈し、そして5µlを50µlの最終反応容積中で使用した。この反応物は、ヌクレオチドの最終濃度0.2mM、最終各プライマー0.2µMおよびAdvantage cDNAポリメラーゼ混合物1µlを含んだ。第二回の反応に使用したプライマーは、2277-20(5'-AAA CAG GAT CTG GAT AGT CCC TAA G-3'、配列番号14)およびAP2(上記を参照のこと)であった。3'RACEは、同じ反応条件を使用して、第一回の反応のために、異なるプライマーセット2277-22(5'-CCT CAC ATT TGG TTT CAT CCT AGA TC-3'、配列番号15)およびAP1を用い、一方、第二回の反応においてはプライマーセット2277-23(5'-GTC AGT GTA AGG CTG TTA CTG TCC-3'、配列番号16)およびAP2プライマーを使用した。両方の第一回の反応のためのPCR条件は、94 で2分、次いで5サイクル(94 で10秒、72 で2分)、次いで5サイクル(94 で10秒、70 で2分)、次いでさら

なる25サイクル(94 で10秒、68 で2分)からなる。両方の第二回の反応のためのPCR条件は、第二回においては最後のサイクル条件が25サイクルの代わりに15サイクルで実施されたという点を除いて、第一回の条件と同じであった。RACE産物の配列決定後、ORF全体を増幅するためにプライマーを設計することが可能である。プライマーセット2289-26(5'-CAACACGTCGACCCA CCA TGG ATT CAA GCA CCG CAC ACA GT-3'、配列番号17)および2289-27(5'-CAACAA GCG GCC GCT TAA CAC ATC TTT ATT CTC ACA GTG CT-3'、配列番号18)を、ヒト精巢marathon cDNA上で使用して、上記のRACEの第一回について記載された条件と同じPCR条件を使用してORF全体を増幅した。増幅PCR産物を、適切な制限酵素で消化して、pSPORTプラスミド(Life Science Technology)中にサブクローニングした。

【0278】

(実施例3)

(異なる組織におけるmRNAの存在および分布)

MTEプロット(Clontech、CA)のノーザンプロット分析は、agp-69406-a1が、ヒト成体および胎児の脾臓、成体および胎児の肺、胎盤、ならびに胎児の肝臓において主に発現することを示した。細胞株由来のRNAのノーザンプロット分析はまた、THP-1(急性単球性白血病)における約3.5kBの転写物を検出した。PCR分析は、ヒト脳、腎臓、脾臓、胸腺、成体および胎児の肝臓、筋肉、精巢、胎盤、膵臓、卵巣、前立腺、末梢血白血球、ならびに骨髄においてagp-69406-a1を検出した。

【0279】

MTEプロット(Clontech、CA)のノーザンプロット分析は、agp-96614-a1が、ヒトの精巢において主に発現することを示した。PCR分析は、ヒトの精巢、膵臓、結腸腺腫細胞株(CX-1)および卵巣癌腫細胞株(GI-102)においてagp-96614-a1を検出した。方法の詳細は、以下に含まれる。

【0280】

(RT PCR)

agp - 69406 - a1およびagp - 96614 - a1の発現を試験するために、RT PCRを、テンプレートとして複数組織のcDNAパネル(MTC)を、およびAdvantage cDNAポリメラーゼ混合物(Clontech)を使用して実行した。PCRは、50 μ lの反応容積中の約1 ngのテンプレートDNA、0.2 mMの最終濃度のヌクレオチド、およびAdvantage cDNAポリメラーゼ混合物の1 μ と共、agp - 69406 - a1についてプライマー2323 - 64 (5' - AGC AGG CCT CTT CCT CCT TGC TGA - 3'、配列番号19)および2323 - 63 (5' - TGA ACT CCC AGG GTT GTT GGA GT - 3'、配列番号20)を、agp - 96614 - a1については2323 - 69 (5' - CTG GAG CCT TCCC TAA TTG CAG TGA - 3'、配列番号21)、2323 - 70 (5' - CAA TCA CAA TC C TCT GAG TGG CA - 3'、配列番号22)を最終濃度0.4 μ Mで使用した。サイクル条件は、94 で30秒、(94 で30秒、68 で2分)反復30回、68 で5分であった。

【0281】

(MTEアレイプロット)

(プローブ調製)

agp - 69406 - a1のためのプローブを、PCRおよびゲル精製2回によって調製した。大きさが331塩基対のPCR産物を、Pharmacia PCRビーズを、2323 - 64 (5' - AGC AGG CCT CTT CCT CCT TGC TGA - 3'、配列番号19)、2323 - 61 (5' - CCA AGA CCG TGA AGA ACT CT - 3'、配列番号23)を、最終濃度0.4 μ Mで、およびテンプレートとして約2 ngの全長agp - 69406 DNAを使用して増幅した。サイクル条件は、94 で1分、(94 で30秒、70 で1分30秒)反復30回、72 で10分であった。295塩基対のPCR産物を、プライマー2323 - 69 (5' - CTG G

AG CCT TCC CTA ATT GCA GTG A - 3'、配列番号21)、2323-70(5' - CAA TCA CAA TCC TCT GAG TGG CA - 3'、配列番号22)およびテンプレートとして全長 agp - 96614 DNA を使用して増幅したことを除いて、agp - 96614 - a1 のためのプローブを上記と同様に調製した。

【0282】

(ハイブリダイゼーション)

プローブを、rediprime™II (Amersham Pharmacia Biotech Catalog #RPN-1633) を使用して [- ³²P] dCTP (10mCi/ml Amersham Pharmacia Biotech Catalog #AA0005) で標識し、Sephadex G-50カラム (Boehringer Mannheim Catalog #1273965) で精製し、次いで、2,500rpmで5分間遠心した。76のヒト組織のmRNA由来のcDNAを含む複数組織発現アレイ (Clontech Catalog #7775-1) を、変性切断サケ精巢DNA (Sigma D7656) 1.5mgを含むExpressHyb (Clontech Catalog #S0910) 10ml中で65 °Cで連続攪拌しながら2時間プレハイブリダイズさせた。プローブを、5 × 10⁶ cpmの標識プローブ、30 μgのCot-1 DNA、250 μlの6 × SSC中の150 μgの変性切断サケ精巢DNAを含む、6 × SSCの250 μl中で変性させてプレハイブリダイゼーション混合物に添加し、そして65 °Cで18時間インキュベートした。遊離プローブを、2 × SSC ; 1% SDSで20分間、連続攪拌しながら65 °Cで各々5回洗浄して除去した。55 °Cで連続攪拌しながら、溶液2 (0.1 × SSC ; 0.5% SDS) 中でのさらに2回の20分間の洗浄を実行した。ハイブリダイゼーションを、増感スクリーンを用いて - 70 °CでX線フィルムに曝露することによって検出した。

【0283】

ノーザンプロットを、Amgenで19のヒト造血細胞株から抽出した10 μgの総RNAと共にノーザンMAX - Glyキット (Ambion) を使用して

作製した。ハイブリダイゼーションのために、膜を、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性切断サケ精子DNAと共にExpressハイブリダイゼーション溶液(Clon tech)10ml中で、 65°C で3時間プレハイブリダイズさせた。次いで、readiprimeキット(Amersham)を使用して P^{32} で標識したプローブ(MTEアレイプロットにおいて使用した様式と同じ様式で調製した)を、 $1 \times 10^6\text{cpm}/\text{ml}$ で添加し、そして 65°C で16時間おいた。この膜を、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.05\% \text{SDS}$ で10分間、 65°C で4回洗浄し、そして $1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ で20分間、 65°C で2回洗浄した。次いで、この膜を、 -80°C で一晩X線フィルムに曝露させた。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、第1のヒトCD20/IgEレセプター様ポリペプチド(「agp-96614-a1」と呼ばれる)の核酸配列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図2】

図2は、第2のヒトCD20/IgEレセプター様ポリペプチド(「agp-69406-a1」と呼ばれる)の核酸配列(配列番号3)およびアミノ酸配列(配列番号4)を示す。

【図3】

本発明のヒトCD20/IgEレセプター様ポリペプチド(agp-96614-a1およびagp-69406-a1)と公知のCD20/IgEレセプターファミリーのメンバーとのアミノ酸の相同性を示す。図3において、agp-69406-a1およびagp-96614-a1は、それぞれ、「69406」および「96614」と省略される。

【配列表】


```

att gca gtg aaa aga aaa acc aca gaa act ctg ata ata ttg agc cga 451
Ile Ala Val Lys Arg Lys Thr Thr Glu Thr Leu Ile Ile Leu Ser Arg
      105                      110                      115

ata atg aat ttt ctt agt gcc ctg gga gca ata gct gga atc att ctc 499
Ile Met Asn Phe Leu Ser Ala Leu Gly Ala Ile Ala Gly Ile Ile Leu
      120                      125                      130

ctc aca ttt ggt ttc atc cta gat caa aac tac att tgt ggt tat tct 547
Leu Thr Phe Gly Phe Ile Leu Asp Gln Asn Tyr Ile Cys Gly Tyr Ser
      135                      140                      145                      150

cac caa aat agt cag tgt aag gct gtt act gtc ctg ttc ttg gga att 595
His Gln Asn Ser Gln Cys Lys Ala Val Thr Val Leu Phe Leu Gly Ile
      155                      160                      165

ttg att aca ttg atg act ttc agc att att gaa tta ttc att tct ctg 643
Leu Ile Thr Leu Met Thr Phe Ser Ile Ile Glu Leu Phe Ile Ser Leu
      170                      175                      180

cct ttc tca att ttg ggg tgc cac tca gag gat tgt gat tgt gaa caa 691
Pro Phe Ser Ile Leu Gly Cys His Ser Glu Asp Cys Asp Cys Glu Gln
      185                      190                      195

tgt tgt tgactagcac tgtgagaata aagatgtgtt aaaatctcaa aaaaaaaaaa 747
Cys Cys
      200

aaaaaaaaaa aaa 760

<210> 2
<211> 200
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Asp Ser Ser Thr Ala His Ser Pro Val Phe Leu Val Phe Pro Pro
  1          5          10          15

Glu Ile Thr Ala Ser Glu Tyr Glu Ser Thr Glu Leu Ser Ala Thr Thr
      20          25          30

Phe Ser Thr Gln Ser Pro Leu Gln Lys Leu Phe Ala Arg Lys Met Lys
      35          40          45

Ile Leu Gly Thr Ile Gln Ile Leu Phe Gly Ile Met Thr Phe Ser Phe
      50          55          60

Gly Val Ile Phe Leu Phe Thr Leu Leu Lys Pro Tyr Pro Arg Phe Pro
      65          70          75          80

Phe Ile Phe Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Trp Gly Ser Val Leu Phe Ile
      85          90          95

Asn Ser Gly Ala Phe Leu Ile Ala Val Lys Arg Lys Thr Thr Glu Thr
      100          105

Leu Ile Ile Leu Ser Arg Ile Met Asn Phe Leu Ser Ala Leu Gly Ala
      115          120          125

Ile Ala Gly Ile Ile Leu Leu Thr Phe Gly Phe Ile Leu Asp Gln Asn
      130          135          140

```

Tyr Ile Cys Gly Tyr Ser His Gln Asn Ser Gln Cys Lys Ala Val Thr
 145 150 155 160
 Val Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ile Thr Leu Met Thr Phe Ser Ile Ile
 165 170 175
 Glu Leu Phe Ile Ser Leu Pro Phe Ser Ile Leu Gly Cys His Ser Glu
 180 185 190
 Asp Cys Asp Cys Glu Gln Cys Cys
 195 200

<210> 3
 <211> 982
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (107)..(826)

<400> 3
 ggcaggaaca gccagtggga ggttccagct gacgctccc cagaggtgag ctgatcccca 50
 gccacagcac acaggaccag gctgagagaa cagcatcctc agcctc atg cta tta 115
 Met Leu Leu
 1
 caa tcc caa acc atg ggg gtt tct cac agc ttt aca cca aag ggc atc 163
 Gln Ser Gln Thr Met Gly Val Ser His Ser Phe Thr Pro Lys Gly Ile
 5 10 15
 act atc cct caa aga gag aaa cct gga cac atg tac caa aac gaa gat 211
 Thr Ile Pro Gln Arg Glu Lys Pro Gly His Met Tyr Gln Asn Glu Asp
 20 25 30 35
 tac ctg cag aac ggg ctg cca aca gaa acc acc gtt ctt ggg act gtc 259
 Tyr Leu Gln Asn Gly Leu Pro Thr Glu Thr Thr Val Leu Gly Thr Val
 40 45 50
 cag atc ctg tgt tgc ctg ttg att tca agt ctg ggg gcc atc ttg gtt 307
 Gln Ile Leu Cys Cys Leu Leu Ile Ser Ser Leu Gly Ala Ile Leu Val
 55 60 65
 ttt gct ccc tac ccc tcc cac ttc aat cca gca att tcc acc act ttg 355
 Phe Ala Pro Tyr Pro Ser His Phe Asn Pro Ala Ile Ser Thr Thr Leu
 70 75 80
 atg tct ggg tac cca ttt tta gga gct ctg tgt ttt ggc att act gga 403
 Met Ser Gly Tyr Pro Phe Leu Gly Ala Leu Cys Phe Gly Ile Thr Gly
 85 90 95
 tcc ctg tca att atc tct gga aaa caa tca act aag ccc ttt gac ctg 451
 Ser Leu Ser Ile Ile Ser Gly Lys Gln Ser Thr Lys Pro Phe Asp Leu
 100 105 110 115
 agc agc ttg acc tca aat gca gtg agt tct gtt act gca gga gca ggc 499
 Ser Ser Leu Thr Ser Asn Ala Val Ser Ser Val Thr Ala Gly Ala Gly
 120 125 130

ctc ttc ctc ctt gct gac agc atg gta gcc ctg agg act gcc tct caa 547
 Leu Phe Leu Leu Ala Asp Ser Met Val Ala Leu Arg Thr Ala Ser Gln
 135 140 145

cat tgt ggc tca gaa atg gat tat cta tcc tca ttg cct tat tgg gag 595
 His Cys Gly Ser Glu Met Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Pro Tyr Ser Glu
 150 155 160

tac tat tat cca ata tat gaa atc aaa gat tgt ctc ctg acc agt gtc 643
 Tyr Tyr Tyr Pro Ile Tyr Glu Ile Lys Asp Cys Leu Leu Thr Ser Val
 165 170 175

agt tta aca ggt gtc cta gtg gtg atg ctc atc ttc act gtg ctg gag 691
 Ser Leu Thr Gly Val Leu Val Val Met Leu Ile Phe Thr Val Leu Glu
 180 185 190 195

ctc tta tta gct gca tac agt tct gtc ttt tgg tgg aaa cag ctc tac 739
 Leu Leu Leu Ala Ala Tyr Ser Ser Val Phe Trp Trp Lys Gln Leu Tyr
 200 205 210

tcc aac aac cct ggg agt tca ttt tcc tgg acc cag tca caa gat cat 787
 Ser Asn Asn Pro Gly Ser Ser Phe Ser Ser Thr Gln Ser Gln Asp His
 215 220 225

atc caa cag gtc aaa aag agt tct tca cgg tct tgg ata taagtaactc 836
 Ile Gln Gln Val Lys Lys Ser Ser Ser Arg Ser Trp Ile
 230 235 240

ttggcctcag aggaaggaaa agcaactcaa cactcatggt caagtgtgat tagactttcc 896

tgaatctct gccatttttag ataactgtgaa acaactaaa aaaaaagct tttgtttgt 956

atttgaaaa aaaaaaaaa aaaaaa 982

<210> 4
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Leu Leu Gln Ser Gln Thr Met Gly Val Ser His Ser Phe Thr Pro
 1 5 10 15

Lys Gly Ile Thr Ile Pro Gln Arg Glu Lys Pro Gly His Met Tyr Gln
 20 25 30

Asn Glu Asp Tyr Leu Gln Asn Gly Leu Pro Thr Glu Thr Thr Val Leu
 35 40 45

Gly Thr Val Gln Ile Leu Cys Cys Leu Leu Ile Ser Ser Leu Gly Ala
 50 55 60

Ile Leu Val Phe Ala Pro Tyr Pro Ser His Phe Asn Pro Ala Ile Ser
 65 70 75 80

Thr Thr Leu Met Ser Gly Tyr Pro Phe Leu Gly Ala Leu Cys Phe Gly
 85 90 95

Ile Thr Gly Ser Leu Ser Ile Ile Ser Gly Lys Gln Ser Thr Lys Pro
 100 105 110

Phe Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asn Ala Val Ser Ser Val Thr Ala
 115 120 125
 Gly Ala Gly Leu Phe Leu Leu Ala Asp Ser Met Val Ala Leu Arg Thr
 130 135 140
 Ala Ser Gln His Cys Gly Ser Glu Met Asp Tyr Leu Ser Ser Leu Pro
 145 150 155 160
 Tyr Ser Glu Tyr Tyr Tyr Pro Ile Tyr Glu Ile Lys Asp Cys Leu Leu
 165 170 175
 Thr Ser Val Ser Leu Thr Gly Val Leu Val Val Met Leu Ile Phe Thr
 180 185 190
 Val Leu Glu Leu Leu Leu Ala Ala Tyr Ser Ser Val Phe Trp Trp Lys
 195 200 205
 Gln Leu Tyr Ser Asn Asn Pro Gly Ser Ser Phe Ser Ser Thr Gln Ser
 210 215 220
 Gln Asp His Ile Gln Gln Val Lys Lys Ser Ser Ser Arg Ser Trp Ile
 225 230 235 240

<210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2277-69

<400> 5
 cagcccgttc tgcagtaat cttc 24

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: AP1 Primer

<400> 6
 ccacccctaat acgactcact atagggc 27

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2277-70

<400> 7
 atgtgtccag gttctctctct ttga 24

<210> 8
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: AP2 Primer

 <400> 8
 actcactata gggctcgagc ggc 23

 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2272-72

 <400> 9
 ttactgcagg agcaggcctc ttc 23

 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2272-73

 <400> 10
 cagcatggta gccctgagga ctg 23

 <210> 11
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 2289-28

 <400> 11
 caacacgtcg acccaccatg ctattacaat cccaaacct ggg 43

 <210> 12
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2289-29

 <400> 12
 caacaagcgg ccgcagttgc ttttccttcc tctgaggc 38

 <210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2277-19

 <400> 13
 ggaagataac tccaaaagaa aaggtc 26

 <210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2270-20

 <400> 14
 aaacaggatc tggatagtcc ctaag 25

 <210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2277-22

 <400> 15
 octcacattt ggtttcatcc tagatc 26

 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2277-23

 <400> 16
 gtcagtgtaa ggctgttact gtcc 24

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

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2289-26

 <400> 17
 caacacgtcg acccaccatg gattcaagca ccgcacacag t 41

 <210> 18
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2289-27

<400> 18
 caacaagcgg ccgctaaca catcittatt ctccacagtgc t 41

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2323-64

<400> 19
 agcaggcctc ttccttgctg a 21

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2323-69

<400> 20
 tgaactccca gggttggttg agt 23

<210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2323-69

<400> 21
 ctggagcctt ccctaattgc agtga 25

<210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2323-70

<400> 22
 caatcacaat cctctgagtg gca 23

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 2323-64

<400> 23
 ccaagaccgt gaagaactct 20

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 24
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

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

<400> 25
 Phe Ile Thr Cys Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln
 1 5 10 15

Arg Arg Arg

【図1A】

ヒトcD20/IgEレセプター様cDNA(配列番号1)および"アミノ酸配列" (配列番号2)
 の地図 (Agp-966/4-a1)(cD20RP2)

図1A

1	TTCAGTGCTCCAGGCAGCCCTCAGCACAGAAGAAACAATGGTCTAGACTGAAGTACCAA	60
61	CTAAATCATCTCCCTTTCAAAATATATCACCGACACCCATCATGGATTCAAGCACCGCACACAG	120
1	M D S S T A H S	8
121	TCCGGTGTTCCTGGTATTTCCAGAAATCACTGCTTCAGAATATGAGTCCACAGAACT	180
9	P V F L V F P P E I T A S E Y E S T E L	28
181	TTCAGCCACGACCTTTTCAACTCAAAGCCCTTGGCAAAAATTTTCTAGAAAAATGAA	240
29	S A T T F S T Q S P L Q K L F A R K M K	48
241	AACTTAGGGACTATCCAGATCCTGTTTGGAAATTAAGACCTTTTCTTTGGAGTTAICTT	300
49	I L G T I Q I L F G I M T F S F G V I F	68
301	CCTTTTCACITTTGTTAAAACCATATCCAAGGTTTCCCTTTATATTTTTCAGGATATCC	360
69	L F T L L K P Y P R F P F I F L S G Y P	88
361	ATTCTGGGGCTCTGTTTGTTCATTAATTCAGGACCTTCTTAATTCAGTGAAGAAA	420
89	F W G S V L F I N S G A F L I A V K R K	108
421	AACCACAGAAACTCTGATAATATTGAGCCGAATAATGAATTTTCTTAGTCCCTGGGAGC	480

【 1 B】

(19 号 特 表 (特))

| B

109 T T E T L I I L S R I M N F L S A L G A 128
 481 AATAGCTGGAATCATTCCTCCTCACATTTGGTTTCATCCTAGATCAAACACTACATTTGTGG 540
 129 I A G I I L L T F G F I L D Q N Y I C G 148
 541 TTATTCTCACCAAATAGTCAGTGTAAAGGCTGTTACTGTCTGTTCTTGGGAATTTGAT 600
 149 Y S H Q N S Q C K A V T V L F L G I L I 168
 601 TACATTGATGACTTTCAGCAATTATGAATTTATTCATTTCTCIGCCCTTCTCAATTTGGG 660
 169 T L M T F S I I E L F I S L P F S I L G 188
 661 GTGCCACTCAGAGGATTTGTGANTGIGAACAATGTTGTGACTAGCACCTGTGAGAATAAAG 720
 189 C H S E D C D C E Q C C * 201
 721 ATGTGTTAAAATCTCAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 760

【図2A】

図2A
ヒトcD20/IgEレセプター-系cDNA(配列番号3)のcDNA
アミノ酸配列(配列番号4)の地図(AgP-69406-a1)(cD20RPI)

1	GGCAGGAACAGCCAGTGGGAGGTTCCAGCTGAGGGCTCCCCAGAGGTGAGCTGATCCCCA	60
61	GCCACAGCACACAGGACCAGGCTGCGAGAACAGCATCATCAGCATCATGCTATTACAATC	120
1		5
		M L L Q S
121	CCAAACCATGGGGTTCACAGCTTTACACCCAAAGGCGATCACATATCCCTCAAAGAGA	180
6	Q T M G V S H S F T P K G I T I P Q R E	25
181	GAAACCTGGACACATGTACCAAAACGAAGATTACCTGCAGAACGGCTGCCAACAGAAAC	240
26	K P G H M Y Q N E D Y L Q N G L P T E T	45
241	CACCGTTCITGGGACTGTCCAGATCCCTGTGTTGCCCTGTGATTTCAAGTCTGGGGCCAT	300
46	T V L G T V Q I L C C L L I S S L G A I	65
301	CTTGGTTTTGCTCCCTACCCCTCCCACTCAATCCAGCAATTCACCCACTTTGATGTC	360
66	L V F A P Y P S H F N P A I S T T L M S	85
361	TGGTACCCTTTTAGGAGCTCTGTGTTTTGGCATTACTGGATCCCCTCAATTATCTC	420
86	G Y P F L G A L C F G I T G S L S I I S	105
421	TGGAACAATCAACTAAGCCCTTTGACCTGAGCAGCTTGACCTCAAAATGCAGTGAATTC	480
106	G K Q S T K P F D L S S L T S N A V S S	125

(29)

2 B

481 TGTTACTGCAGGAGCAGGCCCTCTTCCCTTGCTGACAGCATGGTAGCCCTGAGGACTGC 540
126 V T A G A G L F L L A D S M V A L R T A 145

541 CTCTCAACATTGTGGCTCAGAAAATGGATTATCTATCCCTCATTTGCCCTTATTCGGAGTACTA 600
146 S Q H C G S E M D Y L S S L P Y S E Y Y 165

601 TTATCCAATATATGAAATCAAAGATTGTCTCCTGACCAGTGTCAAGTTTAAACAGGTGTCCT 660
166 Y P I Y E I K D C L L T S V S L T G V L 185

661 AGTGGTGATGCTCATCTTCACTGTGTGGAGCTCTTATTAGCTGCATACAGTTCTGTCTTT 720
186 V V M L I F T V L E L L A A Y S S V F 205

721 TTGGTGGAAAACAGCTCTACTCCAACAACCCCTGGGAGTTCATTTTCCCTCGACCCAGTCACA 780
206 W W K Q L Y S N N P G S S F S S T Q S Q 225

781 AGATCATATCCAACAGGTCAAAAAGAGTTCTTCCCGGCTTTGGATATAAGTAACTCTTGG 840
226 D H I Q Q V K K S S S R S W I * 241

841 CCTCAGAGGAAGAAAAGCAACTCACTCATGGTCAAGTGTGATTAGACTTTCCTGAA 900

901 ATCTCTGCCATTTTAGATACCTGTGAAACAACAAAAAAGCTTTTGTGTTTGTATT 960

961 GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 982

【図3A】

hTM4	M---ASH-E	VDN---AELG	SASA-----	HGTFGSETGP	EEL-NT--S	32
hIGERB	MHQIYSRHCR	EEE---STFS	AAMTTMQGME	QMPGAGPGV	PQLGNM--A	44
HURP4	M---TSQFV	RNE---TIIIV	LPS-----	NVINFSQAEK	PE-----P	29
69406	M---LLQSQ	TMG---VSHS	FTP-----	KGITTPQREK	PG-----H	29
IgERbeta	MD---TESNR	RAN---LALP	QEPSSVPAF-	EVLEISPOEV	SSGRLL--K	40
96614	M---DSSTA	HSP---VFLV	FPP-----	-EITASEYES	TEL-SA--T	31
HTPEF86	MNSMTSAVFV	ANSVLVVAFH	NGYFVTFGIM	SHVFLYENSQ	PQVHLVPGNP	50
hCD20	MTFRNSV-	-----N	GTFPAEP-MK	GPIAMQSGEK	P--LFR-RM	34
HTM4SF5	MCTGKCA-	-----	-----	RCVGL----	-----	12
HTAL6	MCYGKCA-	-----	-----	RCIGH----	-----	12
コンセンサス	M.....	...-...-	...-...--...-	50
hTM4	VYHPI-NGS	PD-YQKAKIQ	VLGAIQILNA	AMILALGVEL	GSLQPYHFQ	79
hIGERB	VIHSHLWKL	QEKFLKGEPK	VLGVVQLLTA	IMSLSMGITM	MCMA-SNTYG	93
HURP4	TNQGQ-DSL	KK-HLHAEIK	VIGTIQILQG	MMVLSLGLIL	ASASFSNFT	76
69406	MYQNE-DYL	QN-GLPETET	VLGTVQILCC	LLISSLGAIL	VEAPYPSHFN	76
IgERbeta	SASSPELHW	LT-VLKKKEQ	FLGVTQLLTA	MICLCFGVW	CSVLDI SHIE	89
96614	TFSTQ-SPL	QK-LFARMK	ILGTIQILFG	IMTFSFGVIF	LFTL-LKPYP	77
HTPEF86	PSLVSNNVQ	PVQKALKEK	TEGAIQIIG	LAHIGLGSIM	ATVL-VGEYL	99
hCD20	SSLVG-PTQ	TF-FMRESK	TLGAVQIMAG	LFLHALGGLL	-MIP-AGIYA	78
HTM4SF5	-SLIT----	-----L-	CFVCI-VANA	LLLVPNGE-	-TSW-TMT-N	41
HTAL6	-SLVG----	-----L-	ALLCI-AANI	LLYFPNGE-	-TKY-ASE-N	41
コンセンサス-...E..	.LG.IQLL..	L.....G...	...-...-	100
hTM4	KHFFFTFYT	GYPDWAVFF	CSSGTL SVVA	GIKP-----	-----T-	114
hIGERB	SN--PLSVVI	GYTIWGSVMF	IISGSLSIAT	GIRT-----	-----T-	126
HURP4	QV-TSTLINS	AYPFLGPFYF	IISGSLSIAT	EKRL-----	-----T-	110
69406	PA-ISTTINS	GYPFLGALCF	GTPGSLSIIS	GKQS-----	-----T-	110
IgERbeta	GD-IFSSFA	GYPFWGAIFF	SISGMLSIIS	ERRN-----	-----A-	123
96614	R--FPFIFLS	GYPFWGVSLE	INSGAFLIIV	KRKT-----	-----T-	110
HTPEF86	SLSFYGGF-	PF-W-GGIMF	IISGSLSVAA	ENQP-----	-----YS-	131
hCD20	PICVTWVY-	PL-W-GGIMY	IISGSLLAAT	EKNS-----	-----R-	109
HTM4SF5	HLSLQVWIMG	GF-IGGIMV	LCPGLAAVRA	GGKCCGAGC	CGN-----RC	85
HTAL6	HLSRFVWFYS	GI-VGGGLIM	ILPAFVEIGL	EQDCC-CC	CGHENCGRK	88
コンセンサス	GY...G...F	.ISG.LSI..-...-	...-...-	150
hTM4	-----	-----RQW	IQNSFGMIDA	SATIALVGTG	FLSLNIIVNI	147
hIGERB	-----	-----KGL	VRGSLGMNTT	SSVLAASGIL	INTFSLAFY-	158
HURP4	-----	-----KLL	VHSSLVGSIL	SALSALVGFY	IISVKQATIN	143
69406	-----	-----KPF	DLSSLTNSAV	SSVTAGAGLF	LLADSMVALR	143
IgERbeta	-----	-----TYL	VRGSLGANVA	SSIAGGIGIT	ILIINLKKSL	156
96614	-----	-----ETL	IILSRIMNFI	SALGATAGII	LLTFGPIILDQ	143
HTPEF86	-----	-----YCL	LSGSLGLNIV	SATCSAVGVI	LFTTDL--S	161
hCD20	-----	-----KCL	VRGKMIMNSL	SLFAAISGMI	LSIMDIINIK	142
HTM4SF5	RMLRSVFSSA	FGVLGAIYCL	SVSGAGLRNG	PRCIMN-GEW	GYHEE----D	130
HTAL6	AMLSSVLAAL	IGTAGSGYCV	IVPALGLAEG	PICLDSLGQV	NYTFA----S	134
コンセンサス	-----	-----L	...SLG.N..	S...A..G..	200

【図3B】

(図3の添え字)

hTM4	QSIRSCHSSS	E---	SPDLC	NZMGS	---I	SN-----	-GMVSLI-LI	179
hIGERB	-SFH--H--	-----	P-YC	NYYG	---S	NNCHGTMS IL	MGLDGMV-LL	190
HURP4	PASLQCELEK	N-NLPTRSV	SVFYHDSLYT	TDCYTAKASL	AGTISLM-LI			191
69406	TASQHCQSEM	D-YLSLPPYS	EYYP-IYEI	KDCLLTSVSL	TGVLVVM-LI			190
IgERbeta	AYIH-----	---IHSSQ	KFF-----	E	TKCFMASFS-	TEIVMM-LF		187
96614	NYI-----	-----	C	GYSHQ	---N	SQCKA-----	VTVLELG-IL	167
HTPEF86	IPH-----	PY-----	AYP	DYY-----	---	P--Y	AWGNPG-MA	183
hCD20	ISHELKMSL	NFIRAHPPYI	NIYNCEPAMP	SEKNSPSTQY	CYSIQSLFIG			192
HTM4SF5	TAG-----	AYLLNRFLWD	RCE-----	AP	PRVVEWN-VT			157
HTAL6	TEG-----	QYLLDTSTWS	ECT-----	EP	KHIVEWN-VS			161
コンセンサスY.....-L	250
hTM4	LITLELCVII	STIAM-----	---WCN	---ANCCN-S	-----			203
hIGERB	LSVLEFCIAV	SLSAF-----	---GCK	---VLCCT-P	GGVLI LPSH			224
HURP4	CTLEFCIAV	ITAVL-----	---RWK	---QAYSDFP	GSVLELPHSY			226
69406	FTVLELLIAA	YSSVF-----	---WVK	---QLYSNNP	GSSFSSIQS-			224
IgERbeta	LTILGLGSAV	SLTTC-----	---GAG	---EELKGNK	VPEDRVYEEL			222
96614	ITIMFFSIE	LFISL-----	---PFS	---ILGCH-				190
HTPEF86	ISGVLVWFCL	LEGGI-----	---ACAS	SHFGCQLVOC	---QSSNV			217
hCD20	ILSVMILFAF	FQELVIAGIV	ENENKRCISR	PKSNIVLLSA	EKKKEQTI EI			242
HTM4SF5	LFSLLVAASC	LEIVL-----	---C	---GIQLV-	---NATI			182
HTAL6	LFSLLAIGG	IEFTL-----	---C	---LIQVI-	---NGVL			186
コンセンサス	...L.L...	---C-	300
hTM4	---REISSP-	P-N-----	---SV-	-----	-----			214
hIGERB	SHMAETASPT	PLN-----	---EV-	-----	-----			239
HURP4	IGNSGMSSKM	THD-----	---CGYEELIT	S-----	-----			248
69406	-QDHI QQVK	SSS-----	---RSWI-	-----	-----			240
IgERbeta	NIYSATYSEL	EDP-----	---GEMSPPID	L-----	-----			244
96614	---SEDCCE-	---Q-----	---CC-	-----	-----			200
HTPEF86	---SVIYPNIY	AANP-----	---VIT-	-----	PEP	VTSPPSY SSE		245
hCD20	KKEVVGLTET	SSQPKNEEDI	EIIPIQEEE	EETETNPEP	PQQES SPIE			292
HTM4SF5	---GVFC---	-----	-----	-----	---GDCRKKQ			193
HTAL6	---GGIC---	-----	-----	-----	---GFCCSHQ			197
コンセンサス	-----	-----	-----	-----	350
hTM4	-----							214
hIGERB	-----							239
HURP4	-----							248
69406	-----							240
IgERbeta	-----							244
96614	-----							200
HTPEF86	IQANK							250
hCD20	NDSSP							297
HTM4SF5	DT-PH							197
HTAL6	QQYDC							202
コンセンサス	-----							355

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 01/10048
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K14/705 C12N15/12 C12N15/63 G01N33/53 C12N15/11 C12N5/12 C07K16/18 A61K38/16 A61K48/00 C12N15/62 A61F2/02 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 C07K C12N G01N A61K A61F 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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ADRA C N ET AL: "CLONING OF THE CDNA FOR A HEMATOPOIETIC CELL-SPECIFIC PROTEIN RELATED TO CD20 AND THE BETA SUBUNIT OF THE HIGH-AFFINITY IGE RECEPTOR: EVIDENCE FOR A FAMILY OF PROTEINS WITH FOUR MEMBRANE- SPANNING REGIONS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, 1 October 1994 (1994-10-01), pages 10178-10182, XP002026149 ISSN: 0027-8424 page 10180, column 1, paragraph 2; figures 3,4	1-71
X	EP 0 857 721 A (EISAI CO LTD) 12 August 1998 (1998-08-12) page 16, line 21 -page 17, line 42	64, 65
-/--		
<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		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search: 14 February 2002		Date of mailing of the international search report: 23. 5. 02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-5018		Authorized officer: Schönwasser, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 01/10048

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	LIANG Y. ET AL.: "Identification of a CD20-, FcepsilonRIbeta-, and HTm4-Related Gene Family: Sixteen New MS4A Family Members Expressed in Human and Mouse" GENOMICS, vol. 72, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 119-127, XP002189622 figures 1,2 ---	1-11, 13-17, 23-41, 43,44, 48-50, 52-55, 61,70,71
P,X	ISHIBASHI K ET AL: "Identification of a new multigene four-transmembrane family (MS4A) related to CD20, HTm4 and beta subunit of the high-affinity IgE receptor" GENE, vol. 264, no. 1, 7 February 2001 (2001-02-07), pages 87-93, XP004229777 ISSN: 0378-1119 figure 1 ---	1-11, 13-17, 23-41, 43,44, 48-50, 52-55, 61,70,71
P,X	HULETT M D ET AL: "ISOLATION, TISSUE DISTRIBUTION, AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF A NOVEL TESTIS-SPECIFIC HUMAN FOUR-TRANSMEMBRANE GENE RELATED TO CD20 AND FC EPSILON RI-BETA" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATION, vol. 280, no. 1, 12 January 2001 (2001-01-12), pages 374-379, XP000993330 ISSN: 0006-3002 figures 1,2 -----	1-11, 13-17, 23-41, 43,44, 48-50, 52-55, 61,70,71

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/US 01/10048**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: 28,40,41,44,65-69 incomplete
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-71 all partially

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-71 all partially

A nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of (a) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2, (c) a nucleotide sequence which hybridizes to the complement of (a) or (b), and (d) a nucleotide sequence complementary to any of (a) or (c), or a nucleic acid molecule encoding a polypeptide that is at least 70 % identical to above polypeptide, or mutants of said nucleic acid molecule; vectors comprising said nucleic acid molecule; host cells comprising said vector; a process for producing said polypeptide; a polypeptide produced by said process; a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or its ortholog, or an amino acid sequence that is at least 70 % identical to said amino acid sequence, or mutants thereof; an antibody produced by immunizing an animal with said peptide; a hybridoma that produces a monoclonal antibody that binds to said peptide; a method of detecting or quantitating the amount of CD20/IgE-receptor like polypeptide using said antibody; selective binding agents that specifically bind said polypeptide; a method for treatment using said binding agent; a hybridoma that produces a binding agent; a composition comprising above polypeptide or nucleic acid molecule; a polypeptide comprising a derivative of above polypeptide; a fusion polypeptide comprising above polypeptide; methods for treatment and diagnosis, a device comprising i.a. above polypeptide or cells secreting above polypeptide; a method of identifying a compound which binds to said polypeptide, a transgenic non-human mammal; a method of modulating levels of a polypeptide in an animal administering to the animal above nucleic acid sequence and an array of above polynucleotides.

2. Claims: 1-71 all partially

A nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of (a) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2, (c) a nucleotide sequence which hybridizes to the complement of (a) or (b), and (d) a nucleotide sequence complementary to any of (a) or (c), or a nucleic acid molecule encoding a polypeptide that is at least 70 % identical to above polypeptide, or mutants of said nucleic acid molecule; vectors comprising said nucleic acid molecule; host cells comprising said vector; a process for producing said polypeptide; a polypeptide produced by said process; a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or its ortholog, or an amino acid

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

sequence that is at least 70 % identical to said amino acid sequence, or mutants thereof; an antibody produced by immunizing an animal with said peptide; a hybridoma that produces a monoclonal antibody that binds to said peptide; a method of detecting or quantitating the amount of CD20/IgE-receptor like polypeptide using said antibody; selective binding agents that specifically bind said polypeptide; a method for treatment using said binding agent; a hybridoma that produces a binding agent; a composition comprising above polypeptide or nucleic acid molecule; a polypeptide comprising a derivative of above polypeptide; a fusion polypeptide comprising above polypeptide; methods for treatment and diagnosis, a device comprising i.a. above polypeptide or cells secreting above polypeptide; a method of identifying a compound which binds to said polypeptide, a transgenic non-human mammal; a method of modulating levels of a polypeptide in an animal administering to the animal above nucleic acid sequence and an array of above polynucleotides.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 42, 56, 61 and 66 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Insofar as claim 57 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 28,40,41,44,65-69 incomplete

Present claim 28 and dependent claims 40 and 41 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the property of being a selective binding agent for the claimed CD20/IgE-receptor like polypeptides.

The claims cover all binding agents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such binding agents. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the binding agent by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the binding agents as further defined in claims 29-38.

The same objection holds true for claim 44, which relates to hybridomas producing selective binding agents. The search for claim 44 has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to hybridomas that produce binding agents as further defined in claims 29-38.

Further, present claims 65-69 relate to antagonists of "CD20/IgE-receptor like polypeptide biological activity" and their use in various methods.

Again, the claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such antagonists. In the present case, the claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the process by reference to a result to be achieved. As mentioned above, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claim which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the agents which antagonize

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

CD20/IgE-receptor like polypeptide biological activity as further defined on page 74, line 29-page 30, line 17.

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 65.1(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 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 01/10048

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0857721 A	12-08-1998	AU 7145396 A	28-04-1997
		EP 0857721 A1	12-08-1998
		CA 2233643 A1	10-04-1997
		WO 9712872 A1	10-04-1997
		JP 9249650 A	22-09-1997

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 K 39/395		A 6 1 P 3/10	4 B 0 6 5
48/00		11/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/04		15/04	4 C 0 8 5
3/10		15/06	4 C 0 8 7
11/06		15/08	4 H 0 4 5
15/04		17/00	
15/06		17/06	
15/08		19/02	
17/00		25/00	
17/06		29/00	
19/02			1 0 1
25/00		35/00	
29/00		37/06	
	1 0 1	37/08	
35/00		C 0 7 K 14/705	
37/06		16/28	
37/08		C 1 2 M 1/00	A
C 0 7 K 14/705		C 1 2 N 1/15	
16/28		1/19	
C 1 2 M 1/00		1/21	
C 1 2 N 1/15		C 1 2 P 21/02	C
1/19		C 1 2 Q 1/02	
1/21		1/68	A
5/10		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02		33/50	Z
C 1 2 Q 1/02		33/53	D
1/68		33/566	
G 0 1 N 33/15		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/50		5/00	A
33/53		15/00	F
33/566		A 6 1 K 37/02	

(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, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 FB03

4B024 AA01 AA11 BA63 CA01 GA11
HA20
4B029 AA23 BB15 BB20 CC03 FA01
FA12
4B063 QA05 QA18 QQ79 QQ91 QQ96
QR48 QR77 QS24 QS39 QX01
4B064 AG20 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA06 AA07 AA13 BA01
BA08 BA22 BA23 BA37 ZA02
ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96
ZB02 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26
ZC35
4C085 AA13 AA14 BB31 CC21 EE06
4C087 AA01 BC83 CA12 ZA02 ZA59
ZA66 ZA81 ZA89 ZA96 ZB02
ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZC35
4H045 AA10 AA11 BA41 CA40 DA50
EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	CD20 / IgE受体样分子及其用途		
公开(公告)号	JP2003529361A	公开(公告)日	2003-10-07
申请号	JP2001572592	申请日	2001-03-29
[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	ウェルチャーアンドリユーエイ カルゾーンフランクジェイ		
发明人	ウェルチャー, アンドリユー エイ. カルゾーン, フランク ジェイ.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P11/06 A61P15/04 A61P15/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/705 C07K14/735 C07K16/28 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61K2039/5156 A61P1/04 A61P11/06 A61P15/04 A61P15/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/705 C07K14/70535 C07K16/28 C07K16/2887		
FI分类号	A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P11/06 A61P15/04 A61P15/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/705 C07K16/28 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.F A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA20 4B029/AA23 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA01 4B029/FA12 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS39 4B063/QX01 4B064/AG20 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA37 4C084/ZA02 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/EE06 4C087/AA01 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/ZA02 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZB02 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/193728 2000-03-30 US 09/723258 2000-11-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了新颖的CD20 / IgE受体样多肽和编码该多肽的核酸分子。本发明还提供了载体，宿主细胞，激动剂和拮抗剂（包括选择性结合剂（例如抗体））和产生CD20 / IgE受体样多肽的方法。本发明还提供了用于治疗，诊断，改善和/或预防与CD20 / IgE受体样多肽有关的疾病的方法。

元の残基	結合可能な残基	結合位置
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, Asp, Glu	Leu
Leu	Asp, Glu , Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4- 結合 , Gln	Arg
Met	Asn, 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, Asp, Glu	Leu