

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下からなる群から選択される有効量のポリペプチド：

(a) 残基1～247として配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する、完全なスタニオカルシンポリペプチド；

(b) ATCCプラスミド受託番号第75652号に含まれるcDNAによってコードされるポリペプチド；

(c) ATCCプラスミド受託番号第75652号に含まれるcDNAによってコードされる成熟ポリペプチド；

(d) 配列番号2の15個連続したアミノ酸を含むポリペプチド；

(e) ATCCプラスミド受託番号第75652号のcDNAにハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド；および

(f) 配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する該スタニオカルシンポリペプチドのポリペプチドフラグメントであって、該フラグメントがスタニオカルシン活性を有する、フラグメント；

ならびに薬学的に受容可能なキャリア、を含む薬学的組成物。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドに指向する抗体。

【請求項3】 増加したレベルのスタニオカルシン活性を必要とする患者を処置する方法であって、請求項1に記載の薬学的組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項4】 減少したレベルのスタニオカルシン活性を必要とする患者を処置する方法であって、請求項1に記載の薬学的組成物、請求項2に記載の抗体、またはスタニオカルシンアンタゴニストを該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項5】 神経細胞を処置する方法であって、請求項1に記載の有効量の薬学的組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項6】 前記神経細胞が脳神経細胞である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記脳神経細胞が最終分化している、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】 前記薬学的組成物がポリペプチド (a) を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】 前記薬学的組成物がポリペプチド (b) を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】 前記薬学的組成物がポリペプチド (c) を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】 前記薬学的組成物がポリペプチド (d) を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 12】 前記薬学的組成物がポリペプチド (e) を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 13】 前記薬学的組成物がポリペプチド (f) を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 14】 前記神経細胞が、低酸素または低酸素条件に供される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 15】 前記神経細胞が虚血に起因して損傷している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 16】 前記神経細胞が脳卒中に起因して損傷している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 17】 前記神経細胞が梗塞に起因して損傷している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 18】 前記神経細胞が発作に起因して損傷している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 19】 前記神経細胞が血栓形成に起因して損傷している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 20】 前記神経細胞がカルシウム媒介細胞活性に起因して損傷している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 21】 神経細胞を保護する方法であって、請求項 1 に記載の有効量の薬学的組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 22】 前記神経細胞が大脳神経細胞である、請求項 21 に記載の

方法。

【請求項23】 前記大脳神経細胞が最終分化している、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記薬学的組成物がポリペプチド(a)を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項25】 前記薬学的組成物がポリペプチド(b)を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項26】 前記薬学的組成物がポリペプチド(c)を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項27】 前記薬学的組成物がポリペプチド(d)を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項28】 前記薬学的組成物がポリペプチド(e)を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項29】 前記薬学的組成物がポリペプチド(f)を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項30】 前記神経細胞が、低酸素または低酸素条件に起因する損傷から保護されている、請求項21に記載の方法。

【請求項31】 前記神経細胞が虚血に起因する損傷から保護されている、請求項21に記載の方法。

【請求項32】 前記神経細胞が脳卒中に起因する損傷から保護されている、請求項21に記載の方法。

【請求項33】 前記神経細胞が梗塞に起因する損傷から保護されている、請求項21に記載の方法。

【請求項34】 前記神経細胞が心臓発作に起因する損傷から保護されている、請求項21に記載の方法。

【請求項35】 前記神経細胞が血栓形成に起因する損傷から保護されている、請求項21に記載の方法。

【請求項36】 前記神経細胞がカルシウム媒介細胞活性に起因する損傷から保護されている、請求項21に記載の方法。

【請求項37】 生物学的サンプル中のスタニオカルシンの存在を検出するための方法であって、生物学的サンプル中のスタニオカルシンポリペプチドの発現をアッセイする工程を包含する、方法。

【請求項38】 神経損傷および/もしくは神経疾患もしくは神経障害を検出、予後またはモニタリングする方法であって、生物学的サンプル中のスタニオカルシンポリペプチドの発現をアッセイする工程；ならびに標準遺伝子発現と遺伝子発現のレベルを比較する工程を包含し、それにより、標準レベルと比較したアッセイされたスタニオカルシン発現レベルにおける増加および減少が、神経損傷および/もしくは神経疾患もしくは神経障害、ならびに/または神経損傷および/もしくは神経疾患もしくは神経障害についての素因の指標である、方法。

【請求項39】 前記方法が以下の工程を包含する、請求項38に記載の方法：

(a) 免疫特異的結合が生じ得るような条件下で、抗スタニオカルシン抗体と個体の生物学的サンプルを接触させる工程；および

(b) 該抗体による任意の免疫特異的結合の量を決定および測定する工程。

【請求項40】 アッセイされたスタニオカルシン発現の増加が、神経細胞損傷の指標である、請求項38に記載の方法。

【請求項41】 アッセイされたスタニオカルシン発現の増加が、神経細胞疾患または障害の指標である、請求項38に記載の方法。

【請求項42】 アッセイされたスタニオカルシン発現の増加が、神経細胞損傷についての素因の指標である、請求項38に記載の方法。

【請求項43】 アッセイされたスタニオカルシン発現の増加が、神経細胞疾患または障害についての素因の指標である、請求項38に記載の方法。

【請求項44】 アッセイされたスタニオカルシン発現の減少が、神経細胞損傷の指標である、請求項38に記載の方法。

【請求項45】 アッセイされたスタニオカルシン発現の減少が、神経細胞疾患または障害の指標である、請求項38に記載の方法。

【請求項46】 アッセイされたスタニオカルシン発現の減少が、神経細胞損傷についての素因の指標である、請求項38に記載の方法。

【請求項47】 アッセイされたスタニオカルシン発現の減少が、神経細胞疾患または障害についての素因の指標である、請求項38に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、ヒトスタニオカルシン(STC)ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および他のヒトスタニオカルシン組成物およびそれらに基づいた方法に関する。特定の実施形態では、本発明のスタニオカルシン組成物は、神経細胞を処置または保護するために使用される。さらに、本発明は、ベクター、宿主細胞、抗体、および本発明のスタニオカルシン組成物を産生するための組換えおよび合成方法に関する。本発明のスタニオカルシン組成物の改変に関連した疾患、障害、損傷または傷害を検出または予後するための診断方法がまた提供され、そして、このような疾患、障害、損傷または傷害を処置するための治療方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

サカナスタニオカルシンは、Stanniusの小体と呼ばれる腎臓に隣接した専門化した器官で合成される(Stannius, H. *Über neben niere bei knochenfischon*, *Arch Anat Physiol.*, 6:97-101(1839))。血漿中のカルシウムの上昇したレベルは、スタニオカルシンの分泌のための主要な刺激である(Wagnerら、*Mol Cell Endocrinol.*, 62:31-39(1989); Wagnerら、*Mol Cell Endocrinol.*, 79:129-38(1991))。サカナスタニオカルシンは、腎臓上のカルシウムの取り込みを低くするために、鰹を作用させることによって、カルシウムおよびリン酸塩ホメオスタシスを調節し、それによって、リン酸塩再吸収を増加させ、そして、腸上に作用することによって、腸のカルシウム輸送を阻害する(Fenwickら、*J Exp. Zool.*, 188:125-131(1974); Lafeberら、*Am J. Physiol.*, 254:R891-96(1988); Luら、*Am J. Physiol.*, 267:P1356-62(1994); Sundellら、*J Comp. Physiol. [B]*, 162:489-95(1992))。リン酸カルシウムホメオスタシスのスタニオ

カルシンの調節は、高カルシウム血症に対して保護する。

【0003】

最近、ヒトおよびマウススタニオカルシンのcDNAがクローニングされた(Changら、Mol Cell Endocrinol., 112:241-47(1995); Changら、Mol Cell Endocrinol., 124:185-87(1996); 米国特許第5,837,498号および同5,877,290号)。ヒトスタニオカルシンは、サカナスタニオカルシんと、60%の同一性および80%の類似性を共有する。組換えヒトスタニオカルシンのラットへの注入は、腎臓のリン酸塩排泄を減少することが報告されている(Wagnerら、J. Bone Miner Res., 12:165-171(1997))。さらに、ヒトスタニオカルシンのラットまたはブタ十二指腸粘膜の漿膜表面への添加が、カルシウムの正味吸収を減少させ、リン酸塩の取り込みを増加させることが報告されてきた(Madsenら、Am J. Physiol., 274:G96-102(1998))。

【0004】

Paju細胞の誘導された最終分化したヒト神経の稜由来の神経細胞が、STCの発現を強くアップレギュレートすることが報告されている。さらに、スタニオカルシンの構成的な発現は、ヒトおよびマウス脳における成熟ニューロンに制限されることが報告されている(Zhangら、Am J Pathol., 153:439-45(1998))。

【0005】

大脳ニューロンは、組織虚血に対して大いに脆弱である。カルシウムの動員およびインフラックスは、虚血細胞死の主要な機構として長く考えられている(Seisjoら、J Cereb Blood Flow Metab., 1:155-85(1981); Seisjoら、J Cereb Blood Flow Metab., 9:127-40(1981); Choiら、Trends Neurosci., 18:58-60(1995); Kristianら、Stroke, 29:705-18(1998))。組織化学的な染色が、大脳皮質および海馬の錐体細胞における、そして、小脳のプルキンエ細胞における

、顕著なスタニオカルシン発現を明らかにした(すなわち、虚血に対して高度に敏感であることが公知の脳ニューロン)(例えば、Zhangら、Am. J. Pathol. 153:439-445(1998)およびSeisjeら、J. Cereb. Blood Flow Metab. 1:155-185(1981)を参照のこと)。

【0006】

低酸素条件の有害な効果由来の損傷および/または傷害から神経細胞を保護する方法についての必要性がある。このような方法は、梗塞、脳卒中、および心臓発作のような事象によってもたらされる低酸素の有害な効果を処置、予防するのに有用である。本明細書中上記の引用文献は、このような参考文献が、本発明に対する先行技術である承認として解釈されるべきではない。

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、ヒトスタニオカルシン(STC)ポリヌクレオチド、ポリペプチド、および他のスタニオカルシン組成物、ならびにそれらに基づいた新規の細胞に関する。特定の実施形態において、本発明のスタニオカルシン組成物は、神経細胞を処置または保護するために使用される。さらに、本発明は、ベクター、宿主細胞、抗体、および本発明のスタニオカルシン組成物を産生するための組換えおよび合成方法に関する。本発明のスタニオカルシン組成物の変更に関連した、疾患、障害、損傷または傷害を検出または予後するための診断方法がまた提供され、そして、このような疾患、障害、損傷または傷害を処置する治療方法に関する。

【0008】

(詳細な説明)

(定義)

以下の定義は、本明細書全体を通して使用される特定の用語の理解を容易にするために提供される。

【0009】

本発明において、「単離された(単離した)」とは、その本来の環境(例えば

、それが天然に存在する場合は天然の環境)から取り出された物質をいい、したがって、その天然の状態から「人間の手によって」変更されている。例えば、単離されたポリヌクレオチドは、ベクターまたは物質の組成物の一部であり得るか、あるいは細胞中に含まれ得、そしてなお「単離され」得る。なぜなら、そのベクター、物質の組成物、または特定の細胞は、ポリヌクレオチドの本来の環境ではないからである。用語「単離された」は、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリー、丸ごとの細胞全体またはmRNA調製物、ゲノムDNA調製物(電気泳動により分離されたものおよびプロットへのトランスファーされたものを含む)、せん断された全細胞ゲノムDNA調製物あるいは、当該分野が本発明のポリヌクレオチド/配列の識別する特徴を示せない他の組成物をいわない。

【0010】

本発明において、「分泌」タンパク質とは、ER、分泌小胞、または細胞外間隙にシグナル配列の結果として指向され得るタンパク質、ならびにシグナル配列を必ずしも含まないが細胞外間隙に放出されるタンパク質をいう。分泌タンパク質が、細胞外間隙に放出される場合、この分泌タンパク質は、「成熟」タンパク質を産生するために細胞外プロセッシングを受け得る。細胞外間隙への放出は、エキソサイトーシスおよびタンパク質分解切断を含む多くの機構によって生じ得る。

【0011】

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」とは、配列番号1に含まれる核酸配列を有する分子、またはATCCに寄託されたクローン内に含まれるcDNAをいう。例えば、スタニオカルシンポリヌクレオチドは、5'および3'非翻訳配列、シグナル配列を含むかもしくは含まないコード領域、分泌タンパク質コード領域を含む全長cDNA配列のヌクレオチド配列、ならびにこの核酸配列のフラグメント、エピトープ、ドメイン、および改変体を含み得る。さらに、本明細書で使用される場合、スタニオカルシン「ポリペプチド」とは、広義の場合、ポリヌクレオチドから生じた翻訳されたアミノ酸配列を有する分子をいう。

【0012】

特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、長さが300 kb、200 kb、100 kb、50 kb、15 kb、10 kb、7.5 kb、5 kb、2.5 kb、2.0 kbまたは1 kb以下である。さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書において開示される場合、スタニオカルシンコード配列の少なくとも15個連続するヌクレオチドを含むが、任意のスタニオカルシンイントロンの全てまたは一部を含まない。別の実施形態において、スタニオカルシンコード配列を含むポリヌクレオチドは、ゲノム隣接遺伝子（すなわち、ゲノムにおける目的の遺伝子に対して5'側または3'側）のコード配列を含まない。

【0013】

本発明では、配列番号1として同定された全長スタニオカルシン配列は、しばしば、複数のクローンに含まれる配列を重複させることによって生成された（コンティグ分析）。配列番号1についての配列のすべてまたはほとんどを含む代表的クプラスミドが、1994年1月25日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション（「ATCC」）に寄託され、そしてATCC受託番号75652を与えられた。ATCCは、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USAに位置する。ATCC寄託は、特許手続目的のための微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に拠って行われた。

【0014】

スタニオカルシン「ポリヌクレオチド」はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1に含まれる配列、その相補体、寄託されたプラスミド内のcDNAにハイブリダイズし得るポリヌクレオチドを含む。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、50%ホルムアミド、5×SSC（750 mM NaCl、75 mMクエン酸三ナトリウム）、50 mMリン酸ナトリウム（pH 7.6）、5×デンハルト溶液、10%デキストランサルフェート、および20 µg/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での42度で一晩インキュベーション、続いて0.1×SSC中で約65度にてフィルターを洗浄することをいう。

【0015】

中程度に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件で、スタニオカルシンポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた意図される。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよびシグナル検出の変化は、主として、ホルムアミド濃度（より低い百分率のホルムアミドが、低下したストリンジェンシーを生じる）；塩条件、または温度の操作を通じて達成される。例えば、より低いストリンジェンシー条件は、 $6 \times \text{SSPE}$ ($20 \times \text{SSPE} = 3 \text{ M NaCl} ; 0.2 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 ; 0.02 \text{ M EDTA}, \text{pH} 7.4$)、 $0.5\% \text{ SDS}$ 、 $30\% \text{ホルムアミド}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ サケ精子ブロッキングDNAを含む溶液中、 37°C で一晩のインキュベーション；次いで $1 \times \text{SSPE}$ 、 $0.1\% \text{ SDS}$ を用いた 50°C での洗浄を含む。さらに、さらにより低いストリンジェンシーを達成するために、ストリンジェントなハイブリダイゼーション後に行われる洗浄は、より高い塩濃度（例えば、 $5 \times \text{SSC}$ ）で行われ得る。

【0016】

上記の条件における変化が、ハイブリダイゼーション実験においてバックグラウンドを抑制するために使用される代替的なブロッキング試薬の含有および/または置換によって達成され得ることに留意のこと。代表的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOTT O、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の特許処方物が挙げられる。特異的ブロッキング試薬の含有は、適合性の問題に起因して、上記のハイブリダイゼーション条件の改変を必要とし得る。

【0017】

もちろん、ポリA+配列（例えば、配列表に示されるcDNAの任意の3'末端ポリA+領域（tract））に、またはT（もしくはU）残基の相補的ストレッチにのみハイブリダイズするポリヌクレオチドは、「ポリヌクレオチド」の定義に包含されない。なぜなら、このようなポリヌクレオチドは、ポリ（A）ストレッチまたはその相補体を含む任意の核酸分子（例えば、プライマーとしてオリゴdTを用いて生成される、事実上任意の二本鎖cDNAクローン）にハイブリダイズするからである。

【0018】

スタニオカルシンポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得、これは、非改変RNAもしくは非改変DNAまたは改変RNAもしくは改変DNAであり得る。例えば、スタニオカルシンポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、またはより代表的には二本鎖もしくは一本鎖および二本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、このポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む、三本鎖領域から構成され得る。ポリヌクレオチドはまた、安定性のために、または他の理由のために改変された、1つ以上の改変された塩基またはDNAもしくはRNA骨格を含み得る。「改変された」塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような普通でない塩基が挙げられる。種々の改変が、DNAおよびRNAに対して行われ得；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的に改変された形態を含む。

【0019】

スタニオカルシンポリペプチドは、ペプチド結合または改変されたペプチド結合、すなわち、ペプチドアイソスター(isostere)によって互いに連結したアミノ酸から構成され得、そして遺伝子がコードする20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。このポリペプチドは、翻訳後プロセッシングのような天然のプロセスによって、または当該技術分野で周知の化学改変技術によってのいずれかで、改変され得る。このような改変は、基本テキスト、およびより詳細な研究論文、ならびに多くの研究文献に十分記載される。改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、スタニオカルシンポリペプチドのどこにでも生じ得る。同じ型の改変が、所定のスタニオカルシンポリペプチド中のいくつかの部位で同じまたは種々の程度で存在し得ることが理解される。また、所定のスタニオカルシンポリペプチドは多くの型の改変を含み得る。スタニオカルシンポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝状であり得、そしてこれらは、分枝を含むかまたは含まない、環状であり得

る。環状、分枝状および分枝した環状のスタニオカルシンポリペプチドは、天然の翻訳後プロセスから生じ得るか、または合成方法によって作製され得る。改変としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol) の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化 (pegylation)、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加、およびユビキチン化が挙げられる。(例えば、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 第2版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson編, Academic Press, New York, 1-12頁 (1983); Seiffterら, Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattanら, Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)を参照のこと)。

【0020】

「配列番号1」とは、スタニオカルシンポリヌクレオチド配列をいうが、「配列番号2」とは、スタニオカルシンポリペプチド配列をいう。

【0021】

「生物学的活性を有する」スタニオカルシンポリペプチドとは、特定の生物学的アッセイで測定した場合、用量依存性を伴っても伴わなくても、スタニオカルシンポリペプチド(成熟形態を含む)の活性(例えば、低酸素症に関連する損傷からニューロン細胞を保護する能力)と類似であるが、必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいう。用量依存性が存在する場合、スタニオカルシ

ンポリペプチドの用量依存性と同一である必要はないが、むしろスタニオカルシンポリペプチドと比較した場合に、所定の活性における用量依存性に実質的に類似する（すなわち、候補ポリペプチドは、スタニオカルシンポリペプチドと比較して、より大きな活性を示すか、または約1/25以上、そして好ましくは約1/10以上の活性、そして最も好ましくは約1/3以上の活性を示す）。

【0022】

（スタニオカルシンポリヌクレオチドおよびポリペプチド）

プラスミドH L F B E 10をヒト初期肺cDNAライブラリーから単離した。このプラスミドは、配列番号2として同定されるコード領域全体を含む。寄託されたプラスミドは、総数約1283ヌクレオチドを有するcDNAを含み、これは、247アミノ酸残基の推定オープンリーディングフレームをコードする（図1を参照のこと）。このオープンリーディングフレームは、ヌクレオチド位置45に位置するN末端メチオニンで始まり、ヌクレオチド位置788の終止コドンで終わる。このスタニオカルシンタンパク質の推定分子量は、約2.6kDaであるべきである。

【0023】

引き続くノーザン分析はまた、胸腺および骨髄からの血清細胞におけるスタニオカルシン発現を示した。BLAST分析を使用して、配列番号2が、*Anguilla australis*からのスタニオカルシンに相通的であることが、最初に見出された。

【0024】

配列番号1として同定されるスタニオカルシンヌクレオチド配列を、寄託されたプラスミドから得られる、部分的に相同な（「重複する」）配列から構築された。重複する配列は、高い冗長性の単一の連続した配列に構築され、配列番号1として同定される最終的な配列を得た。

【0025】

従って、配列番号1および翻訳される配列番号2は、十分に正確であり、そしてそうでなければ、当該分野において周知でありかつ以下でさらに記載される種々の使用に適切である。例えば、配列番号1は、配列番号1において含まれる核

酸配列または寄託されたプラスミドに含まれるcDNAを検出する核酸ハイブリダイゼーションプローブを設計するために有用である。これらのプローブはまた、生物学的サンプル中の核酸分子にハイブリダイズし、それによって本発明の種々の法医学の方法、および診断の方法を可能にする。同様に、配列番号2から同定されるポリペプチドは、スタニオカルシンに特異的に結合する抗体を生成するために使用され得る。

【0026】

それにもかかわらず、配列決定反応によって生じるDNA配列は、配列決定のエラーを含み得る。エラーは、誤って同定されたヌクレオチドとして、または生じたDNA配列におけるヌクレオチドの挿入または欠失として存在する。誤って挿入されたか、または欠失されたヌクレオチドは、推定アミノ酸配列のリーディングフレームにおいてフレームシフトを引き起こす。これらの場合において、生じたDNA配列は、実際のDNA配列と99.9%（例えば、1000塩基を超えるオープンリーディングフレームにおける1塩基の挿入または欠失）を超えて同一であり得るにもかかわらず、推定アミノ酸配列は、実際のアミノ酸配列とは異なる。

【0027】

従って、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列における正確さを必要とするこれらの適用のために、本発明は、配列番号1として同定された作製されたヌクレオチド配列、および配列番号2として同定された推定の翻訳されたアミノ酸配列のみではなく、表1において記載されるような、ATCCに寄託されたスタニオカルシンのヒトcDNAを含むプラスミドDNAのサンプルもまた提供する。寄託されたスタニオカルシンプラスミドのヌクレオチド配列は、公知の方法に従って寄託されたプラスミドの配列決定により容易に決定され得る。次いで、推定スタニオカルシンアミノ酸配列は、このような寄託物から証明され得る。さらに、寄託されたプラスミドによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列はまた、ペプチド配列決定により、または寄託されたヒトスタニオカルシンcDNAを含む適切な宿主細胞中でタンパク質を発現し、このタンパク質を収集し、そしてその配列を決定することにより、直接的に決定され得る。

【0028】

本発明はまた、配列番号1、配列番号2、および/または寄託されたプラスミドに対応するスタニオカルシン遺伝子に関する。このスタニオカルシン遺伝子は、本明細書中に開示される配列情報を使用して、公知の方法に従って単離され得る。このような方法は、開示された配列からプローブまたはプライマーを調製する工程、およびゲノム物質の適切な供給源からスタニオカルシン遺伝子を同定または増幅する工程を包含する。

【0029】

スタニオカルシンの種ホモログもまた、本発明において提供される。種ホモログは、本明細書中に提供される適切なプローブまたはプライマーを作製し、そして所望のホモログについての適切な拡散供給源をスクリーニングすることによって単離および同定され得る。

【0030】

スタニオカルシンポリペプチドは、任意の適切な様式で調製され得る。そのようなポリペプチドとしては、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え的に生成されたポリペプチド、合成的に生成されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせによって生成されたポリペプチドが挙げられる。このようなポリペプチドを調製するための手段は、当該分野において十分に理解されている。

【0031】

スタニオカルシンポリペプチドは、分泌タンパク質の形態（成熟形態を含む）であり得るか、またはより大きなタンパク質（例えば、融合タンパク質）の一部であり得る（下記を参照のこと）。分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、精製において補助する配列（例えば、多重のヒスチジン残基）、または組換え生成の間の安定性のためのさらなる配列を含むさらなるアミノ酸配列を含むことは、しばしば有利である。

【0032】

本発明の方法に従って使用され得るスタニオカルシンポリペプチドおよびポリヌクレオチド（ならびにそのアゴニストまたはアンタゴニスト）は、米国特許第5,837,498号および同第5,877,290号（これらの内容は、本明

細書中で、その全体が参考として援用される)にさらに記載される。

【0033】

スタニオカルシンポリペプチドは、好ましくは単離された形態で提供され、そして好ましくは実質的に精製される。スタニオカルシンポリペプチドの組換え的に生成されたバージョン(分泌ポリペプチドを含む)は、本明細書中で記載される技術か、または当該分野で別の公知の技術を使用して(例えば、SmithおよびJohnson(Gene 67:31-40(1988))により記載される1工程方法によって)、実質的に精製され得る。スタニオカルシンポリペプチドはまた、本明細書中で記載される技術、または当該分野における他の周知の方法を使用して(例えば、当該分野で周知の方法でスタニオカルシンタンパク質に対して惹起された本発明の抗体を使用することによって)、天然の供給源または組換え供給源から精製され得る。

【0034】

(ポリヌクレオチドおよびポリペプチド改変体)

「改変体」とは、本発明のスタニオカルシンポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるがそれらの特性は保持している、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。一般的に、改変体は全体的に非常に類似しており、そして、多くの領域において、本発明のスタニオカルシンポリヌクレオチドまたはポリペプチドと同一である。

【0035】

本発明の参照ヌクレオチド配列に、例えば、少なくとも95%「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸とは、そのヌクレオチド配列が、スタニオカルシンポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり5つまでの点変異を含み得ることを除いて、その核酸のヌクレオチド配列が、参照配列に対して同一であることを意図する。換言すれば、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有する核酸を得るために、その参照配列のヌクレオチドの5%までが、欠失され得るか、または別のヌクレオチドで置換され得るか、あるいは、その参照配列中の総ヌクレオチドの5%までの数のヌクレオチドが、その参照配列に挿入され得る。問合せ配列は、配列

癌号1の全体配列(ORF(オープンリーディングフレーム))、または本明細書中で記載されるような特定の任意のフラグメントであり得る。

【0036】

任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが本発明のヌクレオチド配列に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラムを用いて慣習的に決定され得る。問い合わせ配列(本発明の配列)と対象配列との間の最適な全長の適合を決定するための好ましい方法はまた、全体的な配列整列と呼ばれ、Brutlagらのアルゴリズム(Comp. App. Biosci. (1990) 6: 237~245)に基づくFASTDBコンピュータープログラムを使用して決定され得る。配列整列において、この問い合わせ配列および対象配列は両方ともDNA配列である。RNA配列は、UをTに変換することによって比較され得る。上記の全体的な配列整列の結果は、同一性%である。同一性%を計算するためのDNA配列のFASTDB整列において使用される好ましいパラメーターは、以下である: Matrix=Unitary、k-tuple=4、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=30、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty 0.05、Window Size=500または対象ヌクレオチド配列の長さのいずれか短い方。

【0037】

対象配列が、内部欠失のためではなく、5'または3'欠失のために問い合わせ配列よりも短い場合、手動の補正が、その結果に対してなされなければならない。これは、FASTDBプログラムが、同一性%を計算する場合に、対象配列の5'および3'短縮化を計算しないためである。5'または3'末端で短縮化された対象配列について、問い合わせ配列と比較して、同一性%は、一致/整列しない対象配列の5'および3'にある、問い合わせ配列の塩基の数を、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致/整列されるか否かは、FASTDB配列整列化の結果によって決

定される。次いで、このパーセンテージは、同一性%から減算され、特定のパラメーターを使用して上記のFASTDBプログラムによって計算されて、最終的な同一性%スコアに到達する。この補正されたスコアは、本発明の目的のために使用されるものである。FASTDB整列化によって示されるように、対象配列の5'および3'塩基の外側の塩基(これは、問い合わせ配列に一致/整列されない)のみが、同一性%スコアを手動で調整する目的のために計算される。

【0038】

例えば、90塩基の対象配列が、同一性%を決定するために、100塩基の問い合わせ配列に対して整列される。欠失は、対象配列の5'末端で起こり、従って、FASTDB整列化は、5'末端において最初の10塩基の一致/整列を示さない。10個の不对塩基は、配列の10%(5'および3'末端の一致しない塩基数/問い合わせ配列における塩基の総数)を表し、従って、10%は、FASTDBプログラムによって計算された同一性%スコアから減算される。残りの90塩基が完全に一致した場合、最終的な同一性%は、90%である。別の例において、90塩基の対象配列が、100塩基の問い合わせ配列と比較される。このとき、問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列の5'または3'に塩基がないので、欠失は内部の欠失である。この場合、FASTDBによって計算された同一性%は、手動で補正されない。再度、問い合わせ配列に一致/整列されない対象配列の5'および3'の塩基のみが、手動で補正される。どんな他の手動補正も、本発明の目的のためになされない。

【0039】

本発明の問い合わせアミノ酸配列に少なくとも、例えば95%「同一」であるアミノ酸配列を有するポリヌクレオチドとは、対象ポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列のそれぞれの100アミノ酸あたり5つまでのアミノ酸変化を含み得ることを除けば、対象ポリペプチドのアミノ酸配列が、問い合わせ配列に同一であることを意図する。言い換えれば、問い合わせアミノ酸配列に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るためには、対象配列においてアミノ酸残基の5%までが挿入、欠失、(消去)または別のアミノ酸で置換され得る。これらの参照配列の変化は、参照配列の残基中に個々にか、また

は参照配列内の1つ以上の連続基においてかのいずれかで散在する、参照アミノ酸配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端の位置で、またはそれらの末端位置の間のいずれでも生じ得る。

【0040】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列に、または寄託されたDNAプラスミドによりコードされるアミノ酸配列に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラムを用いて慣習的に決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間の最適な全長の適合を決定するための好ましい方法はまた、全体的な配列整列と呼ばれ、Brutlagらのアルゴリズム（Comp. App. Biosci. (1990) 6: 237~245）に基づくFASTDBコンピュータープログラムを使用して決定され得る。配列整列において、この問い合わせ配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列であるかまたは両方ともアミノ酸配列であるかのいずれかである。上記の全体的な配列整列の結果は、同一性%である。FASTDBアミノ酸整列において使用される好ましいパラメーターは、以下である：Matrix = PAM 0、k-tuple = 2、Mismatch Penalty = 1、Joining Penalty = 20、Randomization Group Length = 0、Cutoff Score = 1、Window Size = 配列長、Gap Penalty = 5、Gap Size Penalty = 0.05、Window Size = 500または対象アミノ酸配列の長さのいずれか短い方。

【0041】

対象配列が、内部欠失ではなくNまたはC末端欠失のために、問い合わせ配列より短い場合、手動補正が結果に対してなされるべきである。これは、FASTDBプログラムが全同一性%を算出する際、対象配列のN末端およびC末端切断を考慮しないためである。N末端およびC末端で切断される対象配列について、問い合わせ配列に比べ、同一性%は、対象配列のN末端およびC末端である問い合わせ配列の残基（対応する対象残基と一致/整列しない）の数を、問い合わせ

配列の全塩基のパーセントとして算出することによって補正される。残基が一致 / 整列するか否かは、FASTDB配列アライメントの結果によって決定される。次いでこのパーセンテージを、同一性%から減算し、特定のパラメーターを使用して上記FASTDBプログラムによって算出し、最終的な同一性%スコアを求める。この最終的な同一性%スコアは、本発明の目的のために使用されるものである。対象配列のN末端およびC末端に対する残基（これは、問い合わせ配列と一致 / 整列されない）のみを、同一性%スコアの手動調節の目的とみなす。すなわち、問い合わせ残基のみが対象配列の最も遠いN末端およびC末端残基の外側に位置する。

【0042】

例えば、90アミノ酸残基対象配列は、同一性%を決定する100残基の問い合わせ配列と整列される。対象配列のN末端で欠失が生じると、それによってFASTDBアライメントは、N末端で最初の10残基の一致 / 整列を示さない。10の対でない残基は、配列の10%（一致しないN末端およびC末端の残基数 / 問い合わせ配列中の残基の総数）を表わす。そのため、FASTDBプログラムより算出される同一性%スコアから10%を減算する。残りの90残基が完全に一致する場合、最終的な同一性%は、90%になる。別の例では、90残基の対象配列は、100残基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は内部欠失であり、問い合わせと一致 / 整列しない対象配列のN末端またはC末端で残基は存在しない。この場合、FASTDBによって算出される同一性%は、手動で補正されない。もう一度、対象配列のN末端およびC末端の外側に位置する残基（問い合わせ配列と一致 / 整列しない）のみが、FASTDBアライメントに提示されるように、手動で補正される。他の手動補正は、本発明の目的のためには行われない。

【0043】

スタニオカルシン改変体は、コード領域、非コード領域または両方における変化を含み得る。特に好ましいのは、サイレントな置換、付加または欠失を生じることがコードされるポリペプチドの特性または活性は変えない変化を含むポリヌクレオチド改変体である。遺伝コードの縮重によるサイレントな置換により産生され

るヌクレオチドの改変体が好ましい。さらに5～10、1～5または1～2のアミノ酸が任意の組み合わせで置換、欠失または付加される改変体もまた好ましい。スタニオカルシンのポリヌクレオチド改変体は、種々の理由、例えば、特定の宿主に対するコドン発現を最適化する（ヒトmRNAにおけるコドンをE. coliのような細菌宿主により好まれるコドンに変える）ために産生され得る。

【0044】

天然に存在するスタニオカルシン改変体は、「対立遺伝子改変体」と呼ばれ、そして生物体の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子のいくつかの代替形態の1つをいう。（Genes II、Lewin、B.、編、John WileyおよびSons、New York（1985）。）これらの対立遺伝子改変体は、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドレベルのいずれかで変化し得る。あるいは、天然に存在しない改変体は、変異誘発性の技術によりまたは直接の合成により産生され得る。

【0045】

タンパク質工学および組換えDNA技術の公知の方法を用いて、改変体は、スタニオカルシンポリペプチドの特徴を改善または変化するように作製され得る。例えば、1つ以上のアミノ酸は、生物学的機能の実質的に損失することなく、分泌タンパク質のN末端またはC末端から欠失され得る。Ronら、J. Biol. Chem.、268：2984～2988（1993）の著者らは、3個、8個または27個のアミノ末端のアミノ酸残基を失った後でさえ、ヘパリン結合活性を有する改変体KGFタンパク質を報告している。同様に、インターフェロンは、このタンパク質のカルボキシ末端から8～10アミノ酸残基を欠失させた後に10倍まで高い活性を示す（Dobeliら、J. Biotechnology 7：199～216（1988））。

【0046】

さらに、改変体が、しばしば天然に存在するタンパク質の活性と同様の生物学的活性を保持することを豊富な証拠が実証する。例えば、Gayleおよび共同研究者ら（J. Biol. Chem. 268：22105～22111（1993））は、ヒトサイトカインIL-1aの大規模な変異性分析を実施した。彼ら

は、ランダム変異誘発を用い、3,500を超える個々のIL-1 α 変異体を作製した。この変異体は、分子の全長にわたって1変異体あたり平均して2.5のアミノ酸が変化していた。複数の変異体が、可能性のあるあらゆるアミノ酸位置で試験された。研究者らは、「[ほとんど]の分子が[結合または生物学的活性]のいずれへの影響もわずかなまま変化され得る」ことを見出した。(要約を参照のこと)実際、試験された3,500を超えるヌクレオチド配列のうちわずか23の特有のアミノ酸配列が、野生型と活性の有意に異なるタンパク質を産生した。

【0047】

さらに、ポリペプチドのN末端またはC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、1つ以上の生物学的機能の改変または損失を生じる場合でさえ、他の生物学的活性はなお維持され得る。例えば、分泌形態を認識する抗体を誘発して/または抗体に結合する欠失改変体の能力は、分泌型形態の大部分より少ない残基がN末端またはC末端から除去される場合、維持されるようである。タンパク質のN末端残基またはC末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を維持するか否かは、本明細書に記載される慣用的な方法および当該分野で公知の別の方法により容易に決定され得る。

【0048】

従って、本発明はさらに、実質的な生物学的活性を示すスタニオカルシンポリペプチド改変体を含む。このような改変体は、当該分野で公知である一般的な規則に従って、活性にほとんど影響しないように選択される欠失、挿入、反転、反復、および置換を含む。

【0049】

本出願は、本明細書中に開示される核酸配列に対して、それらがスタニオカルシン活性を有するポリペプチドをコードするか否かに関係なく、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である核酸分子(例えば、配列番号2のm-nとして以下に開示されるNおよび/またはC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする)に関する。なぜならば、これは、特定の核酸分子がスタニオカルシン活性を有するポリペプチドをコードしな

い場合ですら、当業者はどのようにこの核酸分子を使用するか（例えば、ハイブリダイゼーションプローブとしてまたはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーとして）をなお知っているからである。スタニオカルシン活性を有するポリペプチドをコードしない本発明の核酸分子の使用としては、特に、（１）cDNAライブラリー中のスタニオカルシン遺伝子またはその対立遺伝子改変体を単離すること；（２）Vermaら、Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques、Pergamon Press、New York（1988）に記載されるような、スタニオカルシン遺伝子の正確な染色体位置を提供するための、分裂中期染色体スプレッド（metaphase chromosomal spread）に対するインサイチュハイブリダイゼーション（例えば、FISH）；および（３）特定の組織におけるスタニオカルシンmRNA発現を検出するためのノーザンプロット分析が挙げられる。

【0050】

しかし、本明細書中に開示される核酸配列に対して、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列を有する核酸分子が好ましく、これは、実際に、スタニオカルシンタンパク質活性を有するポリペプチドをコードする。「スタニオカルシン機能活性を有するポリペプチド」によって、例えば、特定の免疫アッセイまたは生物学的アッセイにおいて測定されるように、本発明のスタニオカルシンタンパク質（例えば、完全（全長））の活性に対して、類似しているが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドが意図される。例えば、スタニオカルシン機能活性は、スタニオカルシンポリペプチドがスタニオカルシンリガンドに結合する能力を決定することによって慣用的に測定され得る。スタニオカルシン機能活性はまた、ポリペプチド（細胞表面上に存在しないかまたは発現される同族リガンド）の、そのポリペプチドを発現する細胞を誘導する能力を決定することによって測定され得る。

【0051】

もちろん、遺伝暗号の縮重のために、当業者は、寄託されたcDNAの核酸配列に対して、図1（配列番号1）に示される核酸配列に対して、またはそのフラ

グメントに対して、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列を有する多くの核酸分子が、「スタニオカルシン機能活性を有する」ポリペプチドをコードすることを、ただちに認識する。実際、これらのヌクレオチド配列縮重改変体は、それぞれ、すべて同じポリペプチドをコードするため、これは、上記の比較アッセイを行わなくても、当業者には明らかである。当該分野においては、適切な数もまた、それぞれ、スタニオカルシンタンパク質活性のいずれかを有するポリペプチドをコードすることが、このような縮重改変体ではない核酸分子についてさらに認識される。なぜならばこれは、当業者が、十分に、さらに下記の通り、タンパク質の機能に有意に影響しそうにないか、または影響しそうにないかのいずれかであるアミノ酸の置換（例えば、ある脂肪族アミノ酸を第二の脂肪族アミノ酸と置換すること）に気づいているからである。

【0052】

例えば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換を作製する方法に関する指針は、Bowieら、「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions」、Science 247:1306-1310 (1990)において提供され、ここで、著者らは、変化に対するアミノ酸配列の寛容性を研究するための2つの主要なストラテジーがあることを指摘する。

【0053】

第1のストラテジーは、進化の過程の間の天然の選択によるアミノ酸置換の寛容性を利用する。異なる種におけるアミノ酸配列を比較して、保存されるアミノ酸が同定され得る。これらの保存されるアミノ酸は、タンパク質の機能について重要であるようである。対照的に、置換が天然の選別によって寛容されたアミノ酸の位置は、これらの位置がタンパク質の機能に重要ではないことを示す。従って、アミノ酸置換を寛容する位置は改変され得るが、タンパク質の生物学的活性をなおも維持する。

【0054】

第2のストラテジーは、タンパク質機能に重要な領域を同定するために、クローン化された遺伝子の特定の位置でアミノ酸変化を導入するための遺伝子工学を使用する。例えば、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発(分子中の各残基で1つずつのアラニン変異の導入)が、使用され得る。(CunninghamおよびWells, Science 244:1081-1085(1989))。次いで、得られた変異分子は生物学的活性について試験され得る。

【0055】

著者らが言及するように、これらの2つのストラテジーは、タンパク質がアミノ酸置換に驚くほど寛容であることを明らかにした。著者らはさらに、どのアミノ酸変化が、タンパク質中の特定のアミノ酸位置で許容されるようであることを示す。例えば、最も埋もれている(タンパク質の三次構造内の)アミノ酸残基は、非極性側鎖を必要とするが、表面側鎖の特徴は、一般にほとんど保存されない。さらに、寛容される保存的なアミノ酸置換は、脂肪族または疎水性アミノ酸のAla、Val、Leu、およびIleの置換；水酸基残基のSerおよびThrの置換；酸性残基のAspおよびGluの置換；アミド残基のAsnおよびGlnの置換、塩基性残基のLys、Arg、およびHisの置換；芳香族残基のPhe、Tyr、およびTrpの置換、ならびに小さなサイズのアミノ酸のAla、Ser、Thr、Met、およびGlyの置換を含む。

【0056】

例えば、スタニオカルシン(stanniocalcin)のアミノ酸レベルでの部位特異的変化は、特定のアミノ酸を保存的なアミノ酸で置換することによってなされ得る。好ましい保存的な変異としては、以下が挙げられる：A、G、I、L、S、T、またはVで置換されたM1；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL2；Nで置換されたQ3；Qで置換されたN4；A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS5；G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA6；A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV7；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL8；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL9；A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV10；A

、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 1 1 ; A、G、I、L、S、T
、またはMで置換されたV 1 2 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換され
たI 1 3 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 1 4 ; G、I、L
、S、T、M、またはVで置換されたA 1 5 ; A、G、I、L、T、M、または
Vで置換されたS 1 6 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 1 7
; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 1 8 ; K、またはRで置換
されたH 1 9 ; Dで置換されたE 2 0 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置
換されたA 2 1 ; Dで置換されたE 2 2 ; Nで置換されたQ 2 3 ; Qで置換され
たN 2 4 ; Eで置換されたD 2 5 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換さ
れたS 2 6 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 2 7 ; A、G、
I、L、T、M、またはVで置換されたS 2 8 ; H、またはKで置換されたR 3
0 ; H、またはRで置換されたK 3 1 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置
換されたS 3 2 ; H、またはKで置換されたR 3 3 ; A、G、I、L、S、T、
またはMで置換されたV 3 4 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換された
A 3 5 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 3 6 ; Nで置換され
たQ 3 7 ; Qで置換されたN 3 8 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換さ
れたS 3 9 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 4 0 ; Dで置換
されたE 4 1 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 4 2 ; A、G
、I、L、S、T、またはMで置換されたV 4 3 ; H、またはKで置換されたR
4 4 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 4 6 ; Qで置換された
N 4 7 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 4 8 ; G、I、L、
S、T、M、またはVで置換されたA 4 9 ; A、G、I、S、T、M、またはV
で置換されたL 5 0 ; Nで置換されたQ 5 1 ; A、G、I、L、S、T、または
Mで置換されたV 5 2 ; A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG 5 3
; A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG 5 5 ; G、I、L、S、T
、M、またはVで置換されたA 5 6 ; W、またはYで置換されたF 5 7 ; G、I
、L、S、T、M、またはVで置換されたA 5 8 ; A、G、I、S、T、M、ま
たはVで置換されたL 6 0 ; Dで置換されたE 6 1 ; Qで置換されたN 6 2 ; A
、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 6 3 ; A、G、I、L、S、M

、またはVで置換されたT 6 4 ; Eで置換されたD 6 6 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 6 7 ; Eで置換されたD 6 8 ; A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG 6 9 ; A、G、I、L、S、T、またはVで置換されたM 7 0 ; F、またはWで置換されたY 7 1 ; Eで置換されたD 7 2 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI 7 3 ; H、またはRで置換されたK 7 5 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 7 6 ; W、またはYで置換されたF 7 7 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 7 8 ; F、またはWで置換されたY 7 9 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 8 0 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 8 1 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 8 2 ; H、またはRで置換されたK 8 3 ; W、またはYで置換されたF 8 4 ; Eで置換されたD 8 5 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 8 6 ; Nで置換されたQ 8 7 ; A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG 8 8 ; H、またはRで置換されたK 8 9 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 9 0 ; W、またはYで置換されたF 9 1 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 9 2 ; H、またはRで置換されたK 9 3 ; Dで置換されたE 9 4 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 9 5 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 9 6 ; H、またはRで置換されたK 9 7 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI 9 9 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 1 0 0 ; Qで置換されたN 1 0 1 ; A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG 1 0 2 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 1 0 3 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 1 0 4 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 1 0 5 ; H、またはRで置換されたK 1 0 6 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 1 0 7 ; W、またはYで置換されたF 1 0 8 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 1 0 9 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 1 1 0 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI 1 1 1 ; H、またはKで置換されたR 1 1 2 ; H、またはKで置換されたR 1 1 3 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 1 1 5 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 1 1 6 ; W、またはYで置換さ

れたF 1 1 7 ; Nで置換されたQ 1 1 8 ; H、またはKで置換されたR 1 1 9 ;
A、G、I、L、S、T、またはVで置換されたM 1 2 0 ; A、G、L、S、T
、M、またはVで置換されたI 1 2 1 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置
換されたA 1 2 2 ; Dで置換されたE 1 2 3 ; A、G、I、L、S、T、または
Mで置換されたV 1 2 4 ; Nで置換されたQ 1 2 5 ; Dで置換されたE 1 2 6 ;
Dで置換されたE 1 2 7 ; F、またはWで置換されたY 1 2 9 ; A、G、I、L
、T、M、またはVで置換されたS 1 3 0 ; H、またはRで置換されたK 1 3 1
; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 1 3 2 ; Qで置換されたN
1 3 3 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 1 3 4 ; A、G、I
、L、T、M、またはVで置換されたS 1 3 6 ; A、G、L、S、T、M、また
はVで置換されたI 1 3 7 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA
1 3 8 ; H、またはRで置換されたK 1 3 9 ; H、またはKで置換されたR 1 4
0 ; Qで置換されたN 1 4 1 ; Dで置換されたE 1 4 3 ; G、I、L、S、T、
M、またはVで置換されたA 1 4 4 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換
されたI 1 4 5 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 1 4 6 ; D
で置換されたE 1 4 7 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 1 4
8 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 1 4 9 ; Nで置換された
Q 1 5 0 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 1 5 1 ; Qで置換
されたN 1 5 3 ; K、またはRで置換されたH 1 5 4 ; W、またはYで置換され
たF 1 5 5 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 1 5 6 ; Qで置
換されたN 1 5 7 ; H、またはKで置換されたR 1 5 8 ; F、またはWで置換さ
れたY 1 5 9 ; F、またはWで置換されたY 1 6 0 ; Qで置換されたN 1 6 1 ;
H、またはKで置換されたR 1 6 2 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換
されたL 1 6 3 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 1 6 4 ; H
、またはKで置換されたR 1 6 5 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換さ
れたS 1 6 6 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 1 6 7 ; A、
G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 1 6 8 ; Dで置換されたE 1 6 9
; Eで置換されたD 1 7 1 ; Dで置換されたE 1 7 2 ; Eで置換されたD 1 7 3
; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 1 7 4 ; A、G、I、L、

S、T、またはMで置換されたV 175 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 176 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 177 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI 178 ; H、またはKで置換されたR 179 ; Eで置換されたD 180 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 181 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 182 ; A、G、I、L、S、T、またはVで置換されたM 183 ; Dで置換されたE 184 ; H、またはRで置換されたK 185 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI 186 ; A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG 187 ; Qで置換されたN 189 ; A、G、I、L、S、T、またはVで置換されたM 190 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 191 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 192 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 193 ; W、またはYで置換されたF 194 ; K、またはRで置換されたH 195 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI 196 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 197 ; Nで置換されたQ 198 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 199 ; Eで置換されたD 200 ; K、またはRで置換されたH 201 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 203 ; Nで置換されたQ 204 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 205 ; K、またはRで置換されたH 206 ; H、またはKで置換されたR 208 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 209 ; Eで置換されたD 210 ; W、またはYで置換されたF 211 ; Qで置換されたN 212 ; H、またはKで置換されたR 213 ; H、またはKで置換されたR 214 ; H、またはKで置換されたR 215 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 216 ; Qで置換されたN 217 ; Dで置換されたE 218 ; Nで置換されたQ 220 ; H、またはRで置換されたK 221 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 222 ; H、またはRで置換されたK 223 ; A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV 224 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 225 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL 226 ; H、またはKで置換されたR 227 ; Qで置換されたN 228 ; A、G、I、S、T、M、またはVで置換された

L 2 2 9 ; H、またはKで置換されたR 2 3 0 ; A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG 2 3 1 ; Dで置換されたE 2 3 2 ; Dで置換されたE 2 3 3 ; Eで置換されたD 2 3 4 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 2 3 5 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 2 3 7 ; K、またはRで置換されたH 2 3 8 ; A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI 2 3 9 ; H、またはRで置換されたK 2 4 0 ; H、またはKで置換されたR 2 4 1 ; A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT 2 4 2 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 2 4 3 ; K、またはRで置換されたH 2 4 4 ; Dで置換されたE 2 4 5 ; A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS 2 4 6 ; G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA 2 4 7。

【0057】

得られる構築物は、本明細書の全体に記載され、そして当該分野で公知の活性または機能について、慣行的にスクリーニングされ得る。好ましくは、得られる構築物は、増大したスタニオカルシン活性または機能を有するが、残ったスタニオカルシン活性または機能は維持される。より好ましくは、得られる構築物は、1より多くの増大したスタニオカルシン活性または機能を有するが、残ったスタニオカルシン活性または機能は維持される。

【0058】

保存的なアミノ酸置換に加えて、スタニオカルシンの改変体は、(i) 1つ以上の非保存的なアミノ酸残基での置換(ここで、置換されるアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるアミノ酸残基であってもよく、もしくはそうでなくてもよい)、または(ii)置換基を有するアミノ酸残基の1つ以上での置換、または(iii)別の化合物(例えば、ポリペプチドの安定性および/もしくは可溶性を増加するための化合物(例えば、ポリエチレングリコール))との成熟ポリペプチドの融合、または(iv)さらなるアミノ酸(例えば、IgG Fc融合領域ペプチド、血清アルブミン(好ましくは、ヒト血清アルブミン、またはそのフラグメントもしくは改変体)、あるいはリーダー配列または分泌配列、あるいは精製を容易にする配列)とのポリペプチドの融合を含む。このような改変体ポリペプチドは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内であると考えられ

る。

【0059】

例えば、他の荷電されたアミノ酸または中性のアミノ酸での、荷電されたアミノ酸のアミノ酸置換を含むスタニオカルシンポリペプチド改変体は、改善された特性（例えば、より少ない凝集性）を有するポリペプチドを生成し得る。薬学的処方物の凝集は、凝集体の免疫原活性に起因して、活性の減少およびクリアランスの増加の両方をもたらす。（Pinckardら、Clin. Exp. Immunol. 2: 331 - 340 (1967); Robbinsら、Diabetes 36: 838 - 845 (1987); Clelandら、Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307 - 377 (1993)）。

【0060】

例えば、スタニオカルシンの好ましい非保存的置換は、以下を含む：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたM1；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL2；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたQ3；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN4；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS5；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA6；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV7；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL8；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL9；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV10；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL11；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV12；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたI13；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS14；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA15；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または

Cで置換されたS 16 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または
Cで置換されたA 17 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または
Cで置換されたT 18 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F
、W、Y、P、またはCで置換されたH 19 ; H、K、R、A、G、I、L、S
、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE 20 ; D、E
、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA 21 ; H、K
、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで
置換されたE 22 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F
、W、Y、P、またはCで置換されたQ 23 ; D、E、H、K、R、A、G、I
、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN 24 ; H、K
、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで
置換されたD 25 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで
置換されたS 26 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで
置換されたV 27 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで
置換されたS 28 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N
、Q、F、W、Y、またはCで置換されたP 29 ; D、E、A、G、I、L、S
、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 30 ; D、E
、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換
されたK 31 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換
されたS 32 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y
、P、またはCで置換されたR 33 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y
、P、またはCで置換されたV 34 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y
、P、またはCで置換されたA 35 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y
、P、またはCで置換されたA 36 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S
、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたQ 37 ; D、E、H、K
、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換され
たN 38 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換され
たS 39 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換され
たA 40 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y

、 P、またはCで置換されたE 4 1 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y
 、 P、またはCで置換されたV 4 2 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y
 、 P、またはCで置換されたV 4 3 ; D、 E、 A、 G、 I、 L、 S、 T、 M、 V
 、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換されたR 4 4 ; D、 E、 H、 K、 R
 、 A、 G、 I、 L、 S、 T、 M、 V、 N、 Q、 F、 W、 Y、またはPで置換され
 たC 4 5 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換され
 たL 4 6 ; D、 E、 H、 K、 R、 A、 G、 I、 L、 S、 T、 M、 V、 F、 W、 Y
 、 P、またはCで置換されたN 4 7 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y
 、 P、またはCで置換されたS 4 8 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y
 、 P、またはCで置換されたA 4 9 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y
 、 P、またはCで置換されたL 5 0 ; D、 E、 H、 K、 R、 A、 G、 I、 L、 S
 、 T、 M、 V、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換されたQ 5 1 ; D、 E、 H、 K
 、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換されたV 5 2 ; D、 E、 H、 K
 、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換されたG 5 3 ; D、 E、 H、 K
 、 R、 A、 G、 I、 L、 S、 T、 M、 V、 N、 Q、 F、 W、 Y、またはPで置換
 されたC 5 4 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換
 されたG 5 5 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換
 されたA 5 6 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 A、 G、 I、 L、 S、 T、 M、 V
 、 P、またはCで置換されたF 5 7 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y
 、 P、またはCで置換されたA 5 8 ; D、 E、 H、 K、 R、 A、 G、 I、 L、 S
 、 T、 M、 V、 N、 Q、 F、 W、 Y、またはPで置換されたC 5 9 ; D、 E、 H
 、 K、 R、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換されたL 6 0 ; H、 K、 R
 、 A、 G、 I、 L、 S、 T、 M、 V、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで置換
 されたE 6 1 ; D、 E、 H、 K、 R、 A、 G、 I、 L、 S、 T、 M、 V、 F、 W
 、 Y、 P、またはCで置換されたN 6 2 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W
 、 Y、 P、またはCで置換されたS 6 3 ; D、 E、 H、 K、 R、 N、 Q、 F、 W
 、 Y、 P、またはCで置換されたT 6 4 ; D、 E、 H、 K、 R、 A、 G、 I、 L
 、 S、 T、 M、 V、 N、 Q、 F、 W、 Y、またはPで置換されたC 6 5 ; H、 K
 、 R、 A、 G、 I、 L、 S、 T、 M、 V、 N、 Q、 F、 W、 Y、 P、またはCで

置換されたD 6 6 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで
置換されたT 6 7 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F
、W、Y、P、またはCで置換されたD 6 8 ; D、E、H、K、R、N、Q、F
、W、Y、P、またはCで置換されたG 6 9 ; D、E、H、K、R、N、Q、F
、W、Y、P、またはCで置換されたM 7 0 ; D、E、H、K、R、N、Q、A
、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたY 7 1 ; H、K、R
、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換
されたD 7 2 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換
されたI 7 3 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q
、F、W、Y、またはPで置換されたC 7 4 ; D、E、A、G、I、L、S、T
、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK 7 5 ; D、E、H
、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS 7 6 ; D、E、H
、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換され
たF 7 7 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換され
たL 7 8 ; D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P
、またはCで置換されたY 7 9 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P
、またはCで置換されたS 8 0 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P
、またはCで置換されたA 8 1 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P
、またはCで置換されたA 8 2 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N
、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK 8 3 ; D、E、H、K、R、N
、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたF 8 4 ; H
、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、または
Cで置換されたD 8 5 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または
Cで置換されたT 8 6 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V
、F、W、Y、P、またはCで置換されたQ 8 7 ; D、E、H、K、R、N、Q
、F、W、Y、P、またはCで置換されたG 8 8 ; D、E、A、G、I、L、S
、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK 8 9 ; D、E
、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA 9 0 ; D、E
、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換

されたF91; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV92; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK93; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE94; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS95; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL96; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK97; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはPで置換されたC98; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたI99; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA100; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN101; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたG102; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV103; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたT104; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS105; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK106; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV107; D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたF108; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL109; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA110; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたI111; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR112; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR113; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはPで置換されたC114; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS115; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたT116; D、E、H、K、

R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたF 1
17 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P
、またはCで置換されたQ 118 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、
N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 119 ; D、E、H、K、R
、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたM 120 ; D、E、H、K、
R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたI 121 ; D、E、H、K
、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA 122 ; H、K、R、
A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換さ
れたE 123 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換
されたV 124 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、
W、Y、P、またはCで置換されたQ 125 ; H、K、R、A、G、I、L、S
、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE 126 ; H、
K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC
で置換されたE 127 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V
、N、Q、F、W、Y、またはPで置換されたC 128 ; D、E、H、K、R、
N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたY 129
 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS 13
0 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、また
はCで置換されたK 131 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、ま
たはCで置換されたL 132 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、
M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN 133 ; D、E、H、K、R
、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV 134 ; D、E、H、K、
R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはPで置換さ
れたC 135 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換
されたS 136 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置
換されたI 137 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで
置換されたA 138 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、
W、Y、P、またはCで置換されたK 139 ; D、E、A、G、I、L、S、T
、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 140 ; D、E、

H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN141；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはCで置換されたP142；H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE143；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA144；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたI145；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたT146；H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE147；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV148；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV149；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたQ150；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL151；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはCで置換されたP152；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN153；D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたH154；D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたF155；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS156；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN157；D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR158；D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたY159；D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたY160；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN161；D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR162；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL163；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または

Cで置換されたV164 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、
F、W、Y、P、またはCで置換されたR165 ; D、E、H、K、R、N、Q
、F、W、Y、P、またはCで置換されたS166 ; D、E、H、K、R、N、
Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL167 ; D、E、H、K、R、N
、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL168 ; H、K、R、A、G、
I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE1
69 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W
、Y、またはPで置換されたC170 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、
M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたD171 ; H、K、R
、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換
されたE172 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、
W、Y、P、またはCで置換されたD173 ; D、E、H、K、R、N、Q、F
、W、Y、P、またはCで置換されたT174 ; D、E、H、K、R、N、Q、
F、W、Y、P、またはCで置換されたV175 ; D、E、H、K、R、N、Q
、F、W、Y、P、またはCで置換されたS176 ; D、E、H、K、R、N、
Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたT177 ; D、E、H、K、R、N
、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたI178 ; D、E、A、G、I、
L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR179
 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、ま
たはCで置換されたD180 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、
またはCで置換されたS181 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P
、またはCで置換されたL182 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、
P、またはCで置換されたM183 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M
、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE184 ; D、E、A、
G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換された
K185 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換され
たI186 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換さ
れたG187 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q
、F、W、Y、またはCで置換されたP188 ; D、E、H、K、R、A、G、

I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN189；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたM190；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA191；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS192；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL193；D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたF194；D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたH195；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたI196；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL197；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたQ198；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたT199；H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたD200；D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたH201；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはPで置換されたC202；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA203；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたQ204；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたT205；D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたH206；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはCで置換されたP207；D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR208；D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA209；H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたD210；D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはCで置換されたF211；D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN212；D、E、A、G、I、

L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 2 1 3 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 2 1 4 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 2 1 5 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたT 2 1 6 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN 2 1 7 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE 2 1 8 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはCで置換されたP 2 1 9 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたQ 2 2 0 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK 2 2 1 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL 2 2 2 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK 2 2 3 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたV 2 2 4 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL 2 2 5 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL 2 2 6 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 2 2 7 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはCで置換されたN 2 2 8 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたL 2 2 9 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 2 3 0 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたG 2 3 1 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE 2 3 2 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE 2 3 3 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたD 2 3 4 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS 2 3 5 ; D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y

、またはCで置換されたP 2 3 6 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS 2 3 7 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたH 2 3 8 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたI 2 3 9 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたK 2 4 0 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたR 2 4 1 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたT 2 4 2 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS 2 4 3 ; D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたH 2 4 4 ; H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたE 2 4 5 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたS 2 4 6 ; D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはCで置換されたA 2 4 7。

【0061】

得られる構築物は、本明細書の全体に記載され、そして当該分野で公知の活性または機能について、慣行的にスクリーニングされ得る。好ましくは、得られる構築物は、スタニオカルシン活性または機能の損失を有するが、残ったスタニオカルシン活性または機能は維持される。より好ましくは、得られる構築物は、1より多くのスタニオカルシン活性または機能の損失を有するが、残ったスタニオカルシン活性または機能は維持される。

【0062】

さらに、1より多くのアミノ酸（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9および10）は、上記のような置換されたアミノ酸（保存的または非保存的のいずれか）で置換され得る。置換されたアミノ酸は、スタニオカルシタンパク質の全長、成熟、または部分、ならびに以下に示す一般式m - nを有するN末端およびC末端欠失変異体で生じる。

【0063】

本発明のさらなる実施形態は、以下のアミノ酸配列を有するスタニオカルシン

ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する：少なくとも1つのアミノ酸置換を含むが、50を超えるアミノ酸置換を含まず、さらにより好ましくは、40を超えるアミノ酸置換を含まず、さらにより好ましくは、30を超えるアミノ酸置換を含まず、そして、さらになおより好ましくは、20を超えるアミノ酸置換を含まない、アミノ酸配列。当然ながら、好ましさの増大する順番に、ペプチドまたはポリペプチドが、少なくとも1つであるが10、9、8、7、6、5、4、3、2または1を超えないアミノ酸置換を含むスタニオカルシンポリペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有することが、非常に好ましい。特定の実施形態において、図1のアミノ酸配列またはそのフラグメント（例えば、成熟形態および/または本明細書中に記載される他のフラグメント）における付加、置換、および/または欠失の数は、1～5、5～10、5～25、5～50、10～50または50～150個であり、連続したアミノ酸置換が好ましい。

【0064】

（ポリヌクレオチドおよびポリペプチドフラグメント）

本発明はさらに、本明細書中に記載される単離されたアミノ酸分子のフラグメントに関する。例えば、寄託されたcDNA（プラスミドHLFBE10）のヌクレオチド配列、寄託されたcDNAによってコードされるポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列、図1に示されるポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列（配列番号2）、図1に示されるヌクレオチド配列（配列番号1）、またはこれらの相補鎖を有する単離された核酸分子によって、少なくとも15nt長、およびより好ましくは少なくとも約20nt長、なおより好ましくは少なくとも約30nt長、そしてなおより好ましくは、少なくとも約40、50、100、150、200、250、300、325、350、375、400、450、500、550、または600nt長のフラグメントが意図される。これらのフラグメントは、本明細書中で議論されるような診断プローブまたはプライマーが挙げられるがこれらに限定されない多数の用途を有する。当然ながら、より大きなフラグメント（例えば、501～1500nt長のフラグメント）は、寄託されたcDNA（プラスミドHLFBE10）または図1（配列番号1）

に示されるヌクレオチド配列の(全てではない場合)大部分に対応するフラグメントであるため、本発明に従ってまた有用である。例えば、少なくとも20nt長のフラグメントによって、例えば、寄託されたcDNAのヌクレオチド配列、または図1に示されるヌクレオチド配列(配列番号1)からの20以上連続した塩基を含むフラグメントが意図される。

【0065】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドフラグメントの代表的な例としては、例えば、配列番号1のヌクレオチド番号の約1~50、51~100、101~150、151~200、201~250、251~300、301~350、351~400、401~450、451~500、501~550、551~600、651~700、701~750、751~800、800~850、851~900、901~950、951~1000、1001~1050、1051~1100、1101~1150、1151~1200、1201~1250、および1251~1283またはそれに相補的な鎖、あるいは寄託されたクローンにおいて含まれるcDNAを有するフラグメントが挙げられる。この状況において、「約」は、いずれかの末端もしくは両方の末端で、いくつか(5、4、3、2、もしくは1個)のヌクレオチドだけより大きいかまたはより小さい、具体的に示される範囲を含む。

【0066】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドフラグメントは、スタニオカルシンの機能的活性を実証するポリペプチドをコードする。スタニオカルシンの「機能的活性」を実証するポリペプチドによって、完全(全長)スタニオカルシンタンパク質に関連する1つ以上の公知の機能的活性を示し得るポリペプチドが意味される。このような機能的活性としては、生物学的活性(例えば、低酸素または虚血によってチャレンジされるニューロンを保護する能力(例えば、CoCl₂または神経組織での低酸素発作を模倣する他の化合物での処置によって、インビボまたはインビトロで試験される))、抗原性[抗スタニオカルシン抗体に結合する(または結合についてスタニオカルシンポリペプチドと競合する)能力]、免疫原性(スタニオカルシンポリペプチドに結合する抗体を産生する能力)、本発明

のスタニオカルシンポリペプチドと多量体を形成する能力、およびスタニオカルシンポリペプチドのためのレセプターまたはリガンドと結合する能力が挙げられるがこれらに限定されない。

【0067】

スタニオカルシンポリペプチド、ならびにそのフラグメント、改変体、誘導体、およびアナログの機能的活性は、種々の方法によってアッセイされ得る。

【0068】

例えば、抗スタニオカルシン抗体と結合するか、または抗スタニオカルシン抗体との結合に関して全長スタニオカルシンポリペプチドと競合する能力についてアッセイする1つの実施形態において、当該分野において公知の種々のイムノアッセイが使用され得る。このようなアッセイとしては、ラジオイムノアッセイ、E L I S A（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線測定法、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュイムノアッセイ（例えば、金コロイド、酵素または放射性同位体標識を用いる）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ）、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどのような技術を用いる競合および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、抗体結合が、一次抗体上の標識を検出することによって検出される。別の実施形態では、この一次抗体は、この一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態では、この二次抗体が標識される。多くの手段が、免疫アッセイにおける結合の検出について当該分野で公知であり、そして本発明の範囲内である。

【0069】

別の実施形態では、スタニオカルシンリガンドが同定される場合、または本発明のポリペプチドフラグメント、改変体、または誘導体が多量体化する能力が評価される場合、結合は、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、ならびにアフィニティープロットティングのような当該分野で周知の手段によって、アッセイされ得る。一般には、

Phizicky、E.ら、1995、Microbiol. Rev. 59:94-123を参照のこと。別の実施形態では、その基質へのスタニオカルシンの結合の生理学的相関（シグナル伝達）がアッセイされ得る。

【0070】

さらに、本明細書中に記載のアッセイ（例えば、実施例1を参照のこと）および当該分野で公知の他のアッセイは、スタニオカルシンポリペプチドならびにそれらのフラグメント、改変体、誘導体、およびアナログが、スタニオカルシンに関連した生物学的活性（インビトロまたはインビボのいずれか）を惹起する能力を測定するために、慣用的に適用され得る。他の方法は、当業者に公知であり、そして本発明の範囲内である。

【0071】

本発明はさらに、本明細書中に記載されるスタニオカルシンポリペプチドのフラグメントに関する。例えば、寄託されたcDNA（プラスミドHLFBE10）によってコードされる単離されたスタニオカルシンポリペプチドのフラグメント、寄託されたcDNAによってコードされるポリペプチド配列、図1に示されるポリペプチド配列（配列番号2）によって、配列番号2に含まれるポリペプチドフラグメント、または寄託されたプラスミド中に含まれるcDNAによってコードされるポリペプチドフラグメントを包含することが意図される。タンパク質フラグメントは、「自立構造（free-standing）」であり得るか、あるいはより大きなポリペプチド内（そのフラグメントが、部分または領域を、最も好ましくは単一の連続した領域として形成する）に含まれ得る。本発明のポリペプチドフラグメントの代表的な例としては、例えば、コード領域のおよそアミノ酸番号1~20、21~40、41~60、61~80、81~100、102~120、121~140、141~160、161~180、181~200、201~220、221-240、または241-247のフラグメントが挙げられる。さらに、ポリペプチドフラグメントは、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、または150アミノ酸長であり得る。この状況において、「約」は、いずれかの末端もしくは両方の末端で、いくつ（5、4、3、2、もしくは1個）の

アミノ酸だけより大きいかまたはより小さい、具体的に示される範囲を含む。

【0072】

たとえタンパク質のN末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失がこのタンパク質の1つ以上の生物学的機能の改変または損失を生じたとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、スタニオカルシンリガンドに結合する能力）は、依然として保持され得る。例えば、このポリペプチドの完全形態または成熟形態を認識する抗体を誘導および/または結合する短縮型スタニオカルシムテインの能力は、一般に、この完全ポリペプチドまたは成熟ポリペプチドの残基の大部分未満がN末端から除去される場合に保持される。完全ポリペプチドのN末端残基を欠く特定のポリペプチドがこのような免疫学的活性を保持しているか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法および当該分野で公知の他の方法によって容易に決定され得る。多くのN末端アミノ酸残基が欠失したスタニオカルシムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫学的活性をおそらく保持し得る。実際、6つの少ないスタニオカルシンアミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

【0073】

従って、本発明のポリペプチドフラグメントは、アミノ末端またはカルボキシ末端、あるいは両方から一連の残基が欠失された成熟（分泌された）スタニオカルシンタンパク質を含む。例えば、任意の数のアミノ酸（1～60の範囲）は、いずれかの分泌されたスタニオカルシンポリペプチドのアミノ末端から切除され得る。同様に、任意の数のアミノ酸（1～30の範囲）は、分泌されたスタニオカルシンタンパク質のカルボキシ末端から切除され得る。さらに、上記のアミノ末端およびカルボキシ末端の欠失の任意の組み合わせが好ましい。同様に、これらのスタニオカルシンポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドフラグメントがまた、好ましい。

【0074】

特に、スタニオカルシンポリペプチドのN末端欠失は、一般式m - スタニオカルシンによって記載され得、ここでmは2～246の整数であり、ここでmは配列番号2で同定されるアミノ酸残基の位置に対応する。より詳細には、本発明は

、配列番号2の以下の残基のアミノ酸配列を含むか、あるいはこれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する：L - 2 ~ A - 247 ; Q - 3 ~ A - 247 ; N - 4 ~ A - 247 ; S - 5 ~ A - 247 ; A - 6 ~ A - 247 ; V - 7 ~ A - 247 ; L - 8 ~ A - 247 ; L - 9 ~ A - 247 ; V - 10 ~ A - 247 ; L - 11 ~ A - 247 ; V - 12 ~ A - 247 ; I - 13 ~ A - 247 ; S - 14 ~ A - 247 ; A - 15 ~ A - 247 ; S - 16 ~ A - 247 ; A - 17 ~ A - 247 ; T - 18 ~ A - 247 ; H - 19 ~ A - 247 ; E - 20 ~ A - 247 ; A - 21 ~ A - 247 ; E - 22 ~ A - 247 ; Q - 23 ~ A - 247 ; N - 24 ~ A - 247 ; D - 25 ~ A - 247 ; S - 26 ~ A - 247 ; V - 27 ~ A - 247 ; S - 28 ~ A - 247 ; P - 29 ~ A - 247 ; R - 30 ~ A - 247 ; K - 31 ~ A - 247 ; S - 32 ~ A - 247 ; R - 33 ~ A - 247 ; V - 34 ~ A - 247 ; A - 35 ~ A - 247 ; A - 36 ~ A - 247 ; Q - 37 ~ A - 247 ; N - 38 ~ A - 247 ; S - 39 ~ A - 247 ; A - 40 ~ A - 247 ; E - 41 ~ A - 247 ; V - 42 ~ A - 247 ; V - 43 ~ A - 247 ; R - 44 ~ A - 247 ; C - 45 ~ A - 247 ; L - 46 ~ A - 247 ; N - 47 ~ A - 247 ; S - 48 ~ A - 247 ; A - 49 ~ A - 247 ; L - 50 ~ A - 247 ; Q - 51 ~ A - 247 ; V - 52 ~ A - 247 ; G - 53 ~ A - 247 ; C - 54 ~ A - 247 ; G - 55 ~ A - 247 ; A - 56 ~ A - 247 ; F - 57 ~ A - 247 ; A - 58 ~ A - 247 ; C - 59 ~ A - 247 ; L - 60 ~ A - 247 ; E - 61 ~ A - 247 ; N - 62 ~ A - 247 ; S - 63 ~ A - 247 ; T - 64 ~ A - 247 ; C - 65 ~ A - 247 ; D - 66 ~ A - 247 ; T - 67 ~ A - 247 ; D - 68 ~ A - 247 ; G - 69 ~ A - 247 ; M - 70 ~ A - 247 ; Y - 71 ~ A - 247 ; D - 72 ~ A - 247 ; I - 73 ~ A - 247 ; C - 74 ~ A - 247 ; K - 75 ~ A - 247 ; S - 76 ~ A - 247 ; F - 77 ~ A - 247 ; L - 78 ~ A - 247 ; Y - 79 ~ A - 247 ; S - 80 ~ A - 247 ; A - 81 ~ A - 247 ; A - 82 ~ A - 247 ; K - 83 ~ A - 247 ; F - 84 ~ A - 247 ; D - 85 ~ A - 247 ; T - 86 ~ A - 247 ; Q - 87 ~ A - 247 ; G - 88 ~ A - 247 ; K - 89 ~ A - 247 ; A - 90 ~ A - 247 ; F - 91 ~ A - 247 ; V

- 92 ~ A - 247 ; K - 93 ~ A - 247 ; E - 94 ~ A - 247 ; S - 95
~ A - 247 ; L - 96 ~ A - 247 ; K - 97 ~ A - 247 ; C - 98 ~ A -
247 ; I - 99 ~ A - 247 ; A - 100 ~ A - 247 ; N - 101 ~ A - 2
47 ; G - 102 ~ A - 247 ; V - 103 ~ A - 247 ; T - 104 ~ A - 2
47 ; S - 105 ~ A - 247 ; K - 106 ~ A - 247 ; V - 107 ~ A - 2
47 ; F - 108 ~ A - 247 ; L - 109 ~ A - 247 ; A - 110 ~ A - 2
47 ; I - 111 ~ A - 247 ; R - 112 ~ A - 247 ; R - 113 ~ A - 2
47 ; C - 114 ~ A - 247 ; S - 115 ~ A - 247 ; T - 116 ~ A - 2
47 ; F - 117 ~ A - 247 ; Q - 118 ~ A - 247 ; R - 119 ~ A - 2
47 ; M - 120 ~ A - 247 ; I - 121 ~ A - 247 ; A - 122 ~ A - 2
47 ; E - 123 ~ A - 247 ; V - 124 ~ A - 247 ; Q - 125 ~ A - 2
47 ; E - 126 ~ A - 247 ; E - 127 ~ A - 247 ; C - 128 ~ A - 2
47 ; Y - 129 ~ A - 247 ; S - 130 ~ A - 247 ; K - 131 ~ A - 2
47 ; L - 132 ~ A - 247 ; N - 133 ~ A - 247 ; V - 134 ~ A - 2
47 ; C - 135 ~ A - 247 ; S - 136 ~ A - 247 ; I - 137 ~ A - 2
47 ; A - 138 ~ A - 247 ; K - 139 ~ A - 247 ; R - 140 ~ A - 2
47 ; N - 141 ~ A - 247 ; P - 142 ~ A - 247 ; E - 143 ~ A - 2
47 ; A - 144 ~ A - 247 ; I - 145 ~ A - 247 ; T - 146 ~ A - 2
47 ; E - 147 ~ A - 247 ; V - 148 ~ A - 247 ; V - 149 ~ A - 2
47 ; Q - 150 ~ A - 247 ; L - 151 ~ A - 247 ; P - 152 ~ A - 2
47 ; N - 153 ~ A - 247 ; H - 154 ~ A - 247 ; F - 155 ~ A - 2
47 ; S - 156 ~ A - 247 ; N - 157 ~ A - 247 ; R - 158 ~ A - 2
47 ; Y - 159 ~ A - 247 ; Y - 160 ~ A - 247 ; N - 161 ~ A - 2
47 ; R - 162 ~ A - 247 ; L - 163 ~ A - 247 ; V - 164 ~ A - 2
47 ; R - 165 ~ A - 247 ; S - 166 ~ A - 247 ; L - 167 ~ A - 2
47 ; L - 168 ~ A - 247 ; E - 169 ~ A - 247 ; C - 170 ~ A - 2
47 ; D - 171 ~ A - 247 ; E - 172 ~ A - 247 ; D - 173 ~ A - 2
47 ; T - 174 ~ A - 247 ; V - 175 ~ A - 247 ; S - 176 ~ A - 2
47 ; T - 177 ~ A - 247 ; I - 178 ~ A - 247 ; R - 179 ~ A - 2

47 ; D - 180 ~ A - 247 ; S - 181 ~ A - 247 ; L - 182 ~ A - 247 ; M - 183 ~ A - 247 ; E - 184 ~ A - 247 ; K - 185 ~ A - 247 ; I - 186 ~ A - 247 ; G - 187 ~ A - 247 ; P - 188 ~ A - 247 ; N - 189 ~ A - 247 ; M - 190 ~ A - 247 ; A - 191 ~ A - 247 ; S - 192 ~ A - 247 ; L - 193 ~ A - 247 ; F - 194 ~ A - 247 ; H - 195 ~ A - 247 ; I - 196 ~ A - 247 ; L - 197 ~ A - 247 ; Q - 198 ~ A - 247 ; T - 199 ~ A - 247 ; D - 200 ~ A - 247 ; H - 201 ~ A - 247 ; C - 202 ~ A - 247 ; A - 203 ~ A - 247 ; Q - 204 ~ A - 247 ; T - 205 ~ A - 247 ; H - 206 ~ A - 247 ; P - 207 ~ A - 247 ; R - 208 ~ A - 247 ; A - 209 ~ A - 247 ; D - 210 ~ A - 247 ; F - 211 ~ A - 247 ; N - 212 ~ A - 247 ; R - 213 ~ A - 247 ; R - 214 ~ A - 247 ; R - 215 ~ A - 247 ; T - 216 ~ A - 247 ; N - 217 ~ A - 247 ; E - 218 ~ A - 247 ; P - 219 ~ A - 247 ; Q - 220 ~ A - 247 ; K - 221 ~ A - 247 ; L - 222 ~ A - 247 ; K - 223 ~ A - 247 ; V - 224 ~ A - 247 ; L - 225 ~ A - 247 ; L - 226 ~ A - 247 ; R - 227 ~ A - 247 ; N - 228 ~ A - 247 ; L - 229 ~ A - 247 ; R - 230 ~ A - 247 ; G - 231 ~ A - 247 ; E - 232 ~ A - 247 ; E - 233 ~ A - 247 ; D - 234 ~ A - 247 ; S - 235 ~ A - 247 ; P - 236 ~ A - 247 ; S - 237 ~ A - 247 ; H - 238 ~ A - 247 ; I - 239 ~ A - 247 ; K - 240 ~ A - 247 ; R - 241 ~ A - 247 ; T - 242 ~ A - 247。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【0075】

また上記のように、たとえタンパク質のC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失がこのタンパク質の1つ以上の生物学的機能の改変または損失を生じたとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、レセプターに結合する能力）は、依然として保持され得る。例えば、このポリペプチドの完全形態または成熟形態を認識する抗体を誘導および/または結合する短縮型スタニ

オカルシムテインの能力は、一般に、この完全ポリペプチドまたは成熟ポリペプチドの残基の大部分未満がC末端から除去される場合に保持される。完全ポリペプチドのC末端残基を欠く特定のポリペプチドがこのような免疫学的活性を保持しているか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法および当該分野で公知の他の方法によって容易に決定され得る。多くのC末端アミノ酸残基が欠失したスタニオカルシムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫学的活性をおそらく保持し得る。実際、6つの少ないスタニオカルシムアミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

【0076】

従って、本発明はさらに、一般式1-n（ここでnは2~246の整数であり、ここでnは配列番号2において同定されるアミノ酸残基の位置に対応する）によって記載される、図1（配列番号2）に示されるスタニオカルシムポリペプチドのアミノ酸配列のカルボキシ末端から1つ以上の残基が欠失したポリペプチドを提供する。より詳細には、本発明は、配列番号2の以下のアミノ酸配列を含むか、またはこれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する：M-1~S-246；M-1~E-245；M-1~H-244；M-1~S-243；M-1~T-242；M-1~R-241；M-1~K-240；M-1~I-239；M-1~H-238；M-1~S-237；M-1~P-236；M-1~S-235；M-1~D-234；M-1~E-233；M-1~E-232；M-1~G-231；M-1~R-230；M-1~L-229；M-1~N-228；M-1~R-227；M-1~L-226；M-1~L-225；M-1~V-224；M-1~K-223；M-1~L-222；M-1~K-221；M-1~Q-220；M-1~P-219；M-1~E-218；M-1~N-217；M-1~T-216；M-1~R-215；M-1~R-214；M-1~R-213；M-1~N-212；M-1~F-211；M-1~D-210；M-1~A-209；M-1~R-208；M-1~P-207；M-1~H-206；M-1~T-205；M-1~Q-204；M-1~A-203；M-1~C-202；M-1~H-201；M-1~D-200；M-1~T-199；M-1~Q-198；M-1~L-197；M-

1 ~ I - 196 ; M - 1 ~ H - 195 ; M - 1 ~ F - 194 ; M - 1 ~ L - 193 ; M - 1 ~ S - 192 ; M - 1 ~ A - 191 ; M - 1 ~ M - 190 ; M - 1 ~ N - 189 ; M - 1 ~ P - 188 ; M - 1 ~ G - 187 ; M - 1 ~ I - 186 ; M - 1 ~ K - 185 ; M - 1 ~ E - 184 ; M - 1 ~ M - 183 ; M - 1 ~ L - 182 ; M - 1 ~ S - 181 ; M - 1 ~ D - 180 ; M - 1 ~ R - 179 ; M - 1 ~ I - 178 ; M - 1 ~ T - 177 ; M - 1 ~ S - 176 ; M - 1 ~ V - 175 ; M - 1 ~ T - 174 ; M - 1 ~ D - 173 ; M - 1 ~ E - 172 ; M - 1 ~ D - 171 ; M - 1 ~ C - 170 ; M - 1 ~ E - 169 ; M - 1 ~ L - 168 ; M - 1 ~ L - 167 ; M - 1 ~ S - 166 ; M - 1 ~ R - 165 ; M - 1 ~ V - 164 ; M - 1 ~ L - 163 ; M - 1 ~ R - 162 ; M - 1 ~ N - 161 ; M - 1 ~ Y - 160 ; M - 1 ~ Y - 159 ; M - 1 ~ R - 158 ; M - 1 ~ N - 157 ; M - 1 ~ S - 156 ; M - 1 ~ F - 155 ; M - 1 ~ H - 154 ; M - 1 ~ N - 153 ; M - 1 ~ P - 152 ; M - 1 ~ L - 151 ; M - 1 ~ Q - 150 ; M - 1 ~ V - 149 ; M - 1 ~ V - 148 ; M - 1 ~ E - 147 ; M - 1 ~ T - 146 ; M - 1 ~ I - 145 ; M - 1 ~ A - 144 ; M - 1 ~ E - 143 ; M - 1 ~ P - 142 ; M - 1 ~ N - 141 ; M - 1 ~ R - 140 ; M - 1 ~ K - 139 ; M - 1 ~ A - 138 ; M - 1 ~ I - 137 ; M - 1 ~ S - 136 ; M - 1 ~ C - 135 ; M - 1 ~ V - 134 ; M - 1 ~ N - 133 ; M - 1 ~ L - 132 ; M - 1 ~ K - 131 ; M - 1 ~ S - 130 ; M - 1 ~ Y - 129 ; M - 1 ~ C - 128 ; M - 1 ~ E - 127 ; M - 1 ~ E - 126 ; M - 1 ~ Q - 125 ; M - 1 ~ V - 124 ; M - 1 ~ E - 123 ; M - 1 ~ A - 122 ; M - 1 ~ I - 121 ; M - 1 ~ M - 120 ; M - 1 ~ R - 119 ; M - 1 ~ Q - 118 ; M - 1 ~ F - 117 ; M - 1 ~ T - 116 ; M - 1 ~ S - 115 ; M - 1 ~ C - 114 ; M - 1 ~ R - 113 ; M - 1 ~ R - 112 ; M - 1 ~ I - 111 ; M - 1 ~ A - 110 ; M - 1 ~ L - 109 ; M - 1 ~ F - 108 ; M - 1 ~ V - 107 ; M - 1 ~ K - 106 ; M - 1 ~ S - 105 ; M - 1 ~ T - 104 ; M - 1 ~ V - 103 ; M - 1 ~ G - 102 ; M - 1 ~ N - 101 ; M - 1 ~ A - 100 ; M - 1 ~ I - 99 ; M - 1 ~ C - 98 ; M - 1 ~ K - 97 ; M - 1 ~ L - 96 ; M - 1 ~ S - 95 ; M - 1 ~ E - 94 ; M - 1 ~ K - 93 ; M - 1 ~ V - 92 ; M - 1 ~

F - 91 ; M - 1 ~ A - 90 ; M - 1 ~ K - 89 ; M - 1 ~ G - 88 ; M - 1 ~ Q - 87 ; M - 1 ~ T - 86 ; M - 1 ~ D - 85 ; M - 1 ~ F - 84 ; M - 1 ~ K - 83 ; M - 1 ~ A - 82 ; M - 1 ~ A - 81 ; M - 1 ~ S - 80 ; M - 1 ~ Y - 79 ; M - 1 ~ L - 78 ; M - 1 ~ F - 77 ; M - 1 ~ S - 76 ; M - 1 ~ K - 75 ; M - 1 ~ C - 74 ; M - 1 ~ I - 73 ; M - 1 ~ D - 72 ; M - 1 ~ Y - 71 ; M - 1 ~ M - 70 ; M - 1 ~ G - 69 ; M - 1 ~ D - 68 ; M - 1 ~ T - 67 ; M - 1 ~ D - 66 ; M - 1 ~ C - 65 ; M - 1 ~ T - 64 ; M - 1 ~ S - 63 ; M - 1 ~ N - 62 ; M - 1 ~ E - 61 ; M - 1 ~ L - 60 ; M - 1 ~ C - 59 ; M - 1 ~ A - 58 ; M - 1 ~ F - 57 ; M - 1 ~ A - 56 ; M - 1 ~ G - 55 ; M - 1 ~ C - 54 ; M - 1 ~ G - 53 ; M - 1 ~ V - 52 ; M - 1 ~ Q - 51 ; M - 1 ~ L - 50 ; M - 1 ~ A - 49 ; M - 1 ~ S - 48 ; M - 1 ~ N - 47 ; M - 1 ~ L - 46 ; M - 1 ~ C - 45 ; M - 1 ~ R - 44 ; M - 1 ~ V - 43 ; M - 1 ~ V - 42 ; M - 1 ~ E - 41 ; M - 1 ~ A - 40 ; M - 1 ~ S - 39 ; M - 1 ~ N - 38 ; M - 1 ~ Q - 37 ; M - 1 ~ A - 36 ; M - 1 ~ A - 35 ; M - 1 ~ V - 34 ; M - 1 ~ R - 33 ; M - 1 ~ S - 32 ; M - 1 ~ K - 31 ; M - 1 ~ R - 30 ; M - 1 ~ P - 29 ; M - 1 ~ S - 28 ; M - 1 ~ V - 27 ; M - 1 ~ S - 26 ; M - 1 ~ D - 25 ; M - 1 ~ N - 24 ; M - 1 ~ Q - 23 ; M - 1 ~ E - 22 ; M - 1 ~ A - 21 ; M - 1 ~ E - 20 ; M - 1 ~ H - 19 ; M - 1 ~ T - 18 ; M - 1 ~ A - 17 ; M - 1 ~ S - 16 ; M - 1 ~ A - 15 ; M - 1 ~ S - 14 ; M - 1 ~ I - 13 ; M - 1 ~ V - 12 ; M - 1 ~ L - 11 ; M - 1 ~ V - 10 ; M - 1 ~ L - 9 ; M - 1 ~ L - 8 ; M - 1 ~ V - 7。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【0077】

さらに、シグナル配列は、これらのC末端構築物に付加され得る。例えば、配列番号2のアミノ酸1~30、配列番号2のアミノ酸2~30、配列番号2のアミノ酸3~30、配列番号2のアミノ酸4~30、配列番号2のアミノ酸5~30、配列番号2のアミノ酸6~30、配列番号2のアミノ酸7~30、配列番号2のアミノ酸8~30、配列番号2のアミノ酸9~30、配列番号2のアミノ酸

10～30、配列番号2のアミノ酸11～30、配列番号2のアミノ酸12～30、配列番号2のアミノ酸13～30、配列番号2のアミノ酸14～30、配列番号2のアミノ酸15～30、配列番号2のアミノ酸16～30、配列番号2のアミノ酸17～30、配列番号2のアミノ酸18～30、配列番号2のアミノ酸19～30、配列番号2のアミノ酸20～30、配列番号2のアミノ酸21～30、配列番号2のアミノ酸22～30、配列番号2のアミノ酸23～30、配列番号2のアミノ酸24～30、配列番号2のアミノ酸25～30、配列番号2のアミノ酸26～30、配列番号2のアミノ酸27～30、配列番号2のアミノ酸28～30、または配列番号2のアミノ酸29～30は、上記に列挙されるC末端構築物の各々のN末端に付加され得る。

【0078】

さらに、上記のN末端またはC末端の欠失のいずれかを組み合わせて、N末端およびC末端欠失型のスタニオカルシンポリペプチドを産生し得る。本発明はまた、アミノ末端およびカルボキシ末端の両方から1つ以上の欠失したアミノ酸を有するポリペプチドを提供する。このポリペプチドは、一般的に、配列番号2の残基 $m-n$ を有するものとして記載され得、ここで n および m は、上記のような整数である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【0079】

また、ATCC寄託番号75652に含まれるcDNAプラスミドによりコードされる完全スタニオカルシンアミノ酸配列の部分からなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれる。ここでこの部分は、ATCC寄託番号75652に含まれるcDNAプラスミドによりコードされる完全アミノ酸配列のアミノ末端からの1～約246アミノ酸の任意の整数のアミノ酸残基、もしくはカルボキシ末端からの1～246アミノ酸の任意の整数のアミノ酸残基、またはATCC寄託番号75652に含まれるcDNAプラスミドによりコードされる完全アミノ酸配列の上記のアミノ末端欠失およびカルボキシ末端欠失の任意の組み合わせを排除する。上記欠失変異体ポリペプチド形態の全てをコードするポリヌクレオチドもまた提供される。

【0080】

本願はまた、m - nとして本明細書中に記載されるスタニオカルシンポリペプチド配列に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるポリペプチドを含むタンパク質に関する。好ましい実施形態では、本願は、本明細書中に列挙される特定のスタニオカルシンのN末端欠失およびC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるポリペプチドを含むタンパク質に関する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた本発明により含まれる。

【0081】

本発明の特に好ましいフラグメントの中には、スタニオカルシンの構造的または機能的属性により特徴づけられるフラグメントがある。このようなフラグメントは、完全（すなわち、全長）スタニオカルシン（配列番号2）のヘリックスおよびヘリックス形成領域（「領域」）、シートおよびシート形成領域（「領域」）、ターンおよびターン形成領域（「ターン領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル領域」）、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、表面形成領域、および高抗原性指数領域（すなわち、Jameson - Wolfプログラムのデフォルトパラメーターを用いて同定されたように、1.5以上の抗原性指数を有する4つ以上の連続するアミノ酸を含む）を含むアミノ酸残基を含む。特定の好ましい領域は、図3に示される領域であり、そしてこれらの領域としては、図1に示されるアミノ酸配列（配列番号2）の分析により同定された、前述の型の領域が挙げられるが、これらに限定されない。このような好ましい領域としては、以下のコンピュータープログラムのデフォルトパラメーターを使用して推定されるように、以下が挙げられる：Garnier - Robson推定の領域、領域、ターン領域、およびコイル領域；Chou - Fasman推定の領域、領域、ターン領域、およびコイル領域；Kyte - Doolittle推定の親水性領域および疎水性領域；Eisenberg および 両親媒性領域；Emini表面形成領域；ならびにJameson - Wolfの高い抗原性指数領域。これらのポリペプチドをコードする

ポリヌクレオチドがまた、本発明によって含まれる。

【0082】

さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、スタニオカルシンの機能的属性をコードする。この点において、本発明の好ましい実施形態は、スタニオカルシンの、ヘリックスおよびヘリックス形成領域（「領域」）、シートおよびシート形成領域（「領域」）、ターンおよびターン形成領域（「ターン領域」）、コイルおよびコイル形成領域（「コイル領域」）、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、可撓性領域、表面形成領域、および高抗原性指数領域を含むフラグメントを含む。

【0083】

上記のように、図1および/または表Iに示されるスタニオカルシンの構造的属性または機能的属性を表すデータは、デフォルトパラメーターを設定したDNA`STARの種々のモジュールおよびアルゴリズムを用いて作製された。好ましい実施形態において、表IのVII、IX、XII、およびXIV列において示されたデータを使用して、抗原性について高い程度の可能性を示すスタニオカルシンの領域を決定し得る。高い抗原性の領域は、免疫応答の開始プロセスにおいて抗原認識が生じ得る環境下でポリペプチドの表面が露出されている可能性があるポリペプチドの領域を示す値を選択することにより、VII、IX、XII、および/またはXIV列において示されたデータから決定される。

【0084】

この点において特定のこの好ましい領域は図3に示されるが、表Iに示されるように、図3に示されたデータの表形式の表現を用いることにより示されてもよいし、同定されてもよい。図3を作製するために使用したDNA`STARコンピューターアルゴリズム（もともとのデフォルトパラメーターで設定）を、表形式で図3におけるデータを示すために使用した（表1の参照のこと）。図3におけるデータの表形式を使用して、好ましい領域の特定の境界を容易に決定し得る。

【0085】

図3および表Iに示される上記の好ましい領域としては、図1に示されるアミ

ノ酸配列の分析により同定される、上記の型の領域が挙げられるが、これに限定されない。図3および表Iに示されるように、このような好ましい領域としては、Garnier - Robsonの領域、領域、ターン領域、およびコイル領域、Chou - Fasmanの領域、領域、およびターン領域、Kyte - Doolittle親水性領域および疎水性領域、Eisenberg および 両親媒性領域、Karplus - Schulz可撓性領域、Emini表面形成領域、ならびにJameson - Wolfの高い抗原性指数が挙げられる。

【0086】

【表1】

表 I

残基	位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Met	1	A	0.23	0.39	.	.	.	-0.10	0.85
Leu	2	A	T	.	0.03	0.34	.	.	.	0.10	0.89
Gln	3	A	T	.	-0.43	0.41	.	.	.	-0.20	0.71
Asn	4	A	T	.	-0.86	0.63	.	.	.	-0.20	0.53
Ser	5	A	T	.	-1.28	0.70	.	.	F	-0.05	0.53
Ala	6	A	.	.	B	.	.	.	-1.53	0.70	.	.	.	-0.60	0.25
Val	7	A	.	.	B	.	.	.	-1.53	0.94	.	.	.	-0.60	0.12
Leu	8	A	.	.	B	.	.	.	-2.39	1.23	.	.	.	-0.60	0.07
Leu	9	A	.	.	B	.	.	.	-3.28	1.49	.	.	.	-0.60	0.05
Val	10	.	.	B	B	.	.	.	-3.28	1.67	.	.	.	-0.60	0.05
Leu	11	A	.	.	B	.	.	.	-3.28	1.41	.	.	.	-0.60	0.08
Val	12	A	.	.	B	.	.	.	-2.72	1.23	.	.	.	-0.60	0.10
Ile	13	A	.	.	B	.	.	.	-2.50	0.93	.	.	.	-0.60	0.18
Ser	14	A	A	-2.00	0.79	.	.	.	-0.60	0.22
Ala	15	A	A	-1.18	0.59	.	.	.	-0.60	0.43
Ser	16	A	A	-0.37	0.44	.	*	.	-0.60	0.83
Ala	17	A	A	-0.10	-0.24	.	*	.	0.45	1.07
Thr	18	A	A	0.79	-0.13	.	*	.	0.45	1.07
His	19	A	A	1.09	-0.63	.	.	.	0.75	1.38
Glu	20	A	A	1.68	-0.61	.	.	.	0.75	2.36
Ala	21	A	A	1.98	-0.71	.	.	F	1.24	2.63
Glu	22	A	A	2.27	-1.20	.	.	F	1.58	3.23
Gln	23	A	A	1.72	-1.31	.	.	F	1.92	2.50
Asn	24	A	T	.	1.46	-0.67	.	.	F	2.66	1.84
Asp	25	T	T	.	1.24	-0.79	.	*	F	3.40	1.42
Ser	26	T	T	.	1.94	-0.36	.	.	F	2.76	1.27
Val	27	T	C	1.99	-0.76	.	.	F	2.86	1.55
Ser	28	T	C	1.69	-1.16	.	.	F	2.86	1.85
Pro	29	T	C	1.80	-0.77	.	*	F	2.86	1.85
Arg	30	T	T	.	0.94	-1.16	.	.	F	3.06	4.88
Lys	31	T	T	.	0.66	-1.16	.	*	F	3.40	2.70
Ser	32	A	A	0.92	-1.04	*	*	F	2.26	1.77
Arg	33	A	A	1.22	-0.97	*	.	F	1.77	0.91
Val	34	A	A	1.43	-0.57	*	*	.	1.28	0.79
Ala	35	A	A	1.02	-0.17	*	*	.	0.64	0.95
Ala	36	A	T	.	0.39	-0.17	.	*	.	0.70	0.65
Gln	37	A	T	.	0.69	0.33	.	*	F	0.25	0.88
Asn	38	A	T	.	-0.28	-0.31	*	*	F	1.00	1.51
Ser	39	A	T	.	-0.28	-0.17	*	.	F	1.00	1.11
Ala	40	A	A	0.42	-0.03	*	.	F	0.45	0.48
Glu	41	A	A	0.34	-0.43	*	.	.	0.30	0.58
Val	42	A	A	-0.47	-0.26	*	.	.	0.30	0.23
Val	43	A	A	-0.47	0.04	*	.	.	-0.30	0.19
Arg	44	A	A	-0.47	-0.06	*	.	.	0.30	0.18
Cys	45	A	-0.47	0.33	*	.	.	0.10	0.32
Leu	46	A	T	.	-1.28	0.19	*	.	.	0.10	0.43
Asn	47	A	T	.	-0.42	0.23	*	.	.	0.10	0.18
Ser	48	A	T	.	-0.42	0.63	*	*	.	-0.20	0.59
Ala	49	A	-0.88	0.70	*	.	.	-0.40	0.53
Leu	50	A	-0.88	0.44	.	*	.	-0.40	0.33
Gln	51	T	.	.	-0.41	0.61	.	*	.	0.00	0.13
Val	52	T	T	.	-1.00	0.66	.	.	.	0.20	0.13

表 I (続き)

Gly	53	T	T	.	-1.40	0.66	.	.	.	0.20	0.16
Cys	54	T	T	.	-1.40	0.76	.	.	.	0.20	0.08
Gly	55	T	T	.	-1.26	0.86	.	.	.	0.20	0.11
Ala	56	A	A	-2.07	0.79	.	.	.	-0.60	0.06
Phe	57	A	A	-1.21	1.04	.	.	.	-0.60	0.09
Ala	58	A	A	-0.87	0.47	.	.	.	-0.60	0.16
Cys	59	A	A	-0.50	0.44	.	.	.	-0.60	0.25
Leu	60	A	A	-0.47	0.33	.	.	.	0.01	0.38
Glu	61	.	A	.	.	T	.	.	-0.54	0.03	.	.	F	0.87	0.55
Asn	62	T	T	.	0.16	0.10	.	.	F	1.58	0.55
Ser	63	T	T	.	0.43	-0.47	.	.	F	2.64	1.11
Thr	64	T	T	.	1.10	-0.67	.	.	F	3.10	0.92
Cys	65	T	T	.	1.57	-0.67	.	.	F	2.79	0.96
Asp	66	T	T	.	0.97	-0.64	.	.	F	2.48	0.71
Thr	67	T	T	.	0.72	-0.41	.	*	F	1.87	0.48
Asp	68	T	T	.	1.02	-0.14	.	*	F	1.71	1.42
Gly	69	T	T	.	0.44	-0.71	.	*	.	1.55	1.42
Met	70	A	.	.	B	.	.	.	0.44	-0.03	.	*	.	0.30	0.69
Tyr	71	A	.	.	B	.	.	.	0.49	0.06	*	.	.	-0.30	0.22
Asp	72	A	.	.	B	.	.	.	0.50	0.06	*	.	.	-0.30	0.45
Ile	73	A	.	.	B	.	.	.	-0.20	0.01	*	.	.	-0.30	0.60
Cys	74	A	T	.	-0.67	0.19	*	.	.	0.10	0.33
Lys	75	A	T	.	-0.31	0.11	*	.	.	0.10	0.16
Ser	76	A	T	.	-0.37	0.87	*	.	.	-0.20	0.37
Phe	77	A	T	.	-0.96	0.57	*	.	.	-0.20	0.92
Leu	78	A	A	-0.66	0.50	*	.	.	-0.60	0.47
Tyr	79	A	A	0.06	1.00	*	.	.	-0.60	0.35
Ser	80	A	A	-0.69	0.61	*	*	.	-0.60	0.81
Ala	81	A	A	-0.39	0.61	.	*	.	-0.60	0.85
Ala	82	A	A	0.00	-0.07	.	*	.	0.30	0.91
Lys	83	A	A	0.81	-0.34	.	*	.	0.30	0.98
Phe	84	A	A	0.71	-0.33	.	*	F	0.60	1.67
Asp	85	A	A	1.06	-0.40	.	*	F	0.60	1.64
Thr	86	A	T	.	1.06	-0.90	.	*	F	1.30	1.64
Gln	87	A	T	.	0.94	-0.40	.	*	F	1.00	1.91
Gly	88	A	T	.	0.04	-0.40	*	*	F	0.85	0.99
Lys	89	A	T	.	0.79	0.24	*	*	F	0.25	0.51
Ala	90	A	A	0.79	-0.24	.	*	F	0.45	0.59
Phe	91	A	A	0.80	-0.64	.	*	.	0.75	1.03
Val	92	A	A	-0.01	-0.69	*	*	.	0.60	0.69
Lys	93	A	A	0.38	0.00	*	*	F	-0.15	0.56
Glu	94	A	A	-0.33	-0.50	*	*	F	0.60	1.30
Ser	95	A	A	-0.63	-0.71	*	*	F	0.75	0.94
Leu	96	A	A	-0.52	-0.67	*	*	F	0.75	0.33
Lys	97	A	A	0.33	-0.17	*	*	.	0.30	0.19
Cys	98	A	A	-0.06	0.23	*	*	.	-0.30	0.23
Ile	99	A	T	.	-0.91	0.27	*	.	.	0.10	0.28
Ala	100	A	T	.	-0.92	0.23	*	.	.	0.10	0.10
Asn	101	A	T	.	-0.41	0.71	*	*	.	-0.20	0.28
Gly	102	A	T	.	-0.41	0.53	*	*	F	-0.05	0.53
Val	103	A	.	.	B	.	.	.	-0.60	-0.16	.	.	F	0.60	1.05
Thr	104	A	.	.	B	.	.	.	-0.41	-0.01	.	.	F	0.45	0.48
Ser	105	A	.	.	B	.	.	.	-0.63	0.37	.	.	F	-0.15	0.42

表I (続き)

Lys	106	A	.	.	.	B	.	.	.	-1.22	0.63	.	*	F	-0.45	0.47
Val	107	A	.	.	.	B	.	.	.	-1.77	0.49	.	*	.	-0.60	0.33
Phe	108	A	.	.	.	B	.	.	.	-0.80	0.69	.	*	.	-0.60	0.17
Leu	109	A	.	.	.	B	.	.	.	-0.38	0.30	.	*	.	-0.30	0.17
Ala	110	A	.	.	.	B	.	.	.	-0.74	0.30	.	*	.	-0.05	0.44
Ile	111	A	.	.	.	B	.	.	.	-1.09	0.23	.	*	.	0.20	0.28
Arg	112	A	T	-0.54	-0.17	.	*	.	1.45	0.45
Arg	113	T	-0.54	-0.37	.	.	.	2.10	0.64
Cys	114	T	0.27	-0.09	.	*	F	2.50	0.79
Ser	115	T	0.97	-0.37	.	*	F	2.25	0.70
Thr	116	T	1.26	-0.37	.	*	F	1.60	0.70
Phe	117	.	A	T	0.26	0.24	.	*	.	0.75	1.29
Gln	118	A	A	-0.44	0.36	.	*	.	-0.05	0.67
Arg	119	A	A	0.22	0.47	.	*	.	-0.60	0.47
Met	120	A	A	-0.33	-0.01	.	*	.	0.30	0.94
Ile	121	A	A	-0.02	-0.16	.	*	.	0.30	0.40
Ala	122	A	A	0.68	-0.16	.	*	.	0.30	0.36
Glu	123	A	A	0.68	-0.16	.	*	.	0.30	0.63
Val	124	A	A	-0.10	-0.77	.	*	.	0.75	1.55
Gln	125	A	A	0.26	-0.89	.	.	F	0.75	0.82
Glu	126	A	A	0.84	-0.63	.	*	F	0.75	0.74
Glu	127	A	A	1.48	-0.24	.	*	F	0.60	1.34
Cys	128	A	T	0.67	-0.89	.	*	.	1.15	1.55
Tyr	129	A	T	1.52	-0.60	.	*	.	1.00	0.74
Ser	130	A	T	0.67	-0.20	.	*	.	0.70	0.68
Lys	131	A	T	0.00	0.44	.	*	.	-0.20	0.95
Leu	132	A	T	-0.30	0.44	.	*	.	-0.40	0.32
Asn	133	A	-0.52	0.07	.	*	.	0.10	0.32
Val	134	A	T	-0.87	0.37	.	*	.	0.10	0.11
Cys	135	A	T	-0.52	0.87	.	*	.	-0.20	0.14
Ser	136	A	T	-0.46	0.19	.	*	.	0.10	0.17
Ile	137	A	0.36	-0.21	.	*	.	0.80	0.46
Ala	138	A	0.14	-0.46	.	*	.	1.25	1.37
Lys	139	T	1.00	-0.60	.	*	F	2.40	1.58
Arg	140	1.08	-0.99	.	*	F	2.50	3.91
Asn	141	T	0.49	-1.17	.	*	F	3.00	3.91
Pro	142	T	1.07	-0.99	.	*	F	2.70	1.37
Glu	143	A	T	1.66	-0.50	.	*	F	1.90	1.01
Ala	144	A	T	0.76	-0.50	.	*	.	1.45	1.09
Ile	145	A	.	.	.	B	.	.	.	-0.21	-0.26	.	*	.	0.60	0.52
Thr	146	A	.	.	.	B	.	.	.	-0.21	-0.04	.	*	.	0.30	0.22
Glu	147	A	.	.	.	B	.	.	.	-0.81	0.36	.	*	.	-0.30	0.38
Val	148	A	.	.	.	B	.	.	.	-1.02	0.54	.	*	.	-0.60	0.45
Val	149	A	.	.	.	B	.	.	.	-0.43	0.29	.	*	.	-0.30	0.48
Gln	150	A	.	.	.	B	.	.	.	0.42	0.20	.	*	.	-0.30	0.45
Leu	151	T	0.03	0.70	.	*	.	0.00	0.82
Pro	152	T	-0.27	0.84	.	*	.	0.00	0.96
Asn	153	T	0.59	0.59	.	*	.	0.20	0.74
His	154	T	1.56	0.59	.	*	.	0.15	1.45
Phe	155	T	1.31	-0.10	.	*	F	1.45	1.83
Ser	156	T	1.88	0.23	.	*	F	1.10	1.79
Asn	157	T	2.09	0.59	.	*	F	1.25	2.06
Arg	158	T	2.20	0.49	.	*	F	1.50	3.82

表 I (続き)

Tyr	159	T	T	.	1.42	-0.30	*	*	.	2.50	5.58
Tyr	160	T	T	.	1.27	0.00	*	*	.	1.65	2.86
Asn	161	.	.	.	B	T	.	.	1.68	0.24	*	.	.	1.00	1.09
Arg	162	.	.	.	B	T	.	.	1.38	0.24	*	.	.	0.75	1.36
Leu	163	.	.	B	B	.	.	.	0.46	-0.13	*	*	.	0.70	1.16
Val	164	.	.	B	B	.	.	.	-0.11	-0.20	*	.	.	0.30	0.59
Arg	165	.	A	B	0.13	0.09	*	.	.	-0.30	0.25
Ser	166	A	A	-0.53	0.09	*	*	.	-0.30	0.53
Leu	167	A	A	-0.64	-0.03	*	.	.	0.30	0.38
Leu	168	A	A	0.17	-0.67	*	*	.	0.60	0.32
Glu	169	A	A	1.02	-0.67	*	*	.	0.60	0.42
Cys	170	A	A	0.60	-1.06	*	*	F	0.75	0.85
Asp	171	A	T	.	0.04	-1.26	.	.	F	1.30	1.48
Glu	172	A	T	.	0.56	-1.30	.	.	F	1.15	0.64
Asp	173	A	T	.	1.06	-0.91	.	.	F	1.30	1.59
Thr	174	A	T	.	0.17	-1.00	*	*	F	1.30	1.37
Val	175	A	.	.	B	.	.	.	0.94	-0.31	*	.	F	0.45	0.56
Ser	176	A	.	.	B	.	.	.	0.94	-0.31	*	.	F	0.45	0.65
Thr	177	A	.	.	B	.	.	.	0.64	-0.31	*	*	F	0.45	0.75
Ile	178	A	T	.	-0.17	-0.41	*	*	F	1.00	1.36
Arg	179	A	T	.	-0.46	-0.37	*	.	F	0.85	0.84
Asp	180	A	T	.	0.40	-0.14	.	*	F	0.85	0.57
Ser	181	A	T	.	0.74	-0.63	.	*	.	1.15	1.42
Leu	182	A	A	0.17	-1.31	.	*	.	0.75	1.45
Met	183	A	A	0.71	-0.63	.	*	.	0.60	0.61
Glu	184	A	A	0.39	-0.20	.	*	.	0.30	0.45
Lys	185	A	A	0.39	-0.16	*	*	F	0.45	0.84
Ile	186	A	A	0.09	-0.44	*	*	F	0.60	1.37
Gly	187	T	C	0.31	-0.44	*	.	F	1.05	0.78
Pro	188	A	T	.	0.61	0.06	*	.	F	0.25	0.40
Asn	189	A	T	.	-0.20	0.44	*	.	.	-0.20	0.76
Met	190	A	T	.	-0.94	0.44	*	*	.	-0.20	0.63
Ala	191	A	A	-0.09	0.80	.	.	.	-0.60	0.35
Ser	192	A	A	-0.63	0.87	.	.	.	-0.60	0.30
Leu	193	A	A	-1.23	1.16	.	.	.	-0.60	0.21
Phe	194	A	A	-1.23	1.23	.	.	.	-0.60	0.17
His	195	A	A	-0.94	1.13	.	.	.	-0.60	0.22
Ile	196	A	A	-0.36	1.23	.	.	.	-0.60	0.39
Leu	197	A	A	-0.09	0.54	.	.	.	-0.60	0.75
Gln	198	A	A	0.06	0.26	.	.	.	-0.30	0.75
Thr	199	T	T	.	0.17	0.33	.	.	F	0.65	0.58
Asp	200	T	T	.	0.20	0.14	.	.	F	0.65	0.71
His	201	T	T	.	0.78	-0.14	.	.	.	1.10	0.71
Cys	202	T	T	.	1.56	-0.06	.	*	.	1.10	0.71
Ala	203	T	.	.	1.34	-0.04	*	*	.	1.20	0.57
Gln	204	T	.	.	1.77	0.39	*	*	.	0.90	0.65
Thr	205	C	1.18	-0.11	.	*	F	1.90	2.39
His	206	T	C	1.21	-0.19	.	*	F	2.40	2.39
Pro	207	T	C	1.18	-0.69	.	*	F	3.00	2.30
Arg	208	T	T	.	1.77	-0.30	.	*	F	2.60	1.38
Ala	209	T	T	.	1.88	-0.39	.	*	F	2.64	1.63
Asp	210	T	.	.	2.30	-0.89	.	*	.	2.63	2.07
Phe	211	T	.	.	2.44	-1.31	.	*	.	2.67	2.07

表 I (続き)

Asn	212	T	T	.	2.34	-1.31	.	*	.	2.91	4.01
Arg	213	T	T	.	2.23	-1.33	.	*	F	3.40	3.46
Arg	214	T	T	.	2.82	-0.93	.	.	F	3.06	6.43
Thr	215	T	T	.	2.61	-1.71	.	.	F	2.72	6.92
Asn	216	T	T	.	3.31	-1.69	.	.	F	2.18	5.47
Glu	217	3.36	-1.29	.	.	F	1.64	4.83
Pro	218	A	A	C	2.43	-1.29	.	*	F	1.10	4.93
Gln	219	A	A	2.37	-0.60	.	*	F	0.90	2.82
Lys	220	A	A	T	.	.	1.40	-1.09	.	*	F	1.30	3.51
Leu	221	A	A	0.90	-0.84	.	*	F	0.90	1.50
Lys	222	A	A	0.09	-0.16	*	*	F	0.45	0.80
Val	223	A	A	0.20	0.10	*	*	F	-0.15	0.38
Leu	224	A	A	0.41	-0.30	*	*	.	0.30	0.37
Leu	225	A	A	-0.40	0.10	*	*	.	-0.30	0.73
Arg	226	A	A	-0.33	0.10	*	*	.	-0.30	0.30
Asn	227	A	A	0.13	0.10	*	*	.	-0.30	0.79
Leu	228	.	A	C	0.09	-0.11	*	*	F	0.65	0.95
Arg	229	.	A	C	0.94	-0.80	*	*	F	1.10	2.00
Gly	230	.	A	C	1.76	-1.49	*	*	F	1.10	1.77
Glu	231	.	A	C	2.27	-1.49	*	*	F	1.40	1.84
Glu	232	A	A	T	.	.	1.94	-1.50	*	*	F	1.90	2.98
Asp	233	A	A	1.64	-1.76	.	*	F	1.80	2.35
Ser	234	A	A	2.42	-1.37	.	*	F	2.10	3.19
Pro	235	A	T	.	C	1.42	-1.30	*	*	F	3.00	2.51
Ser	236	A	T	.	.	1.81	-0.61	*	.	F	2.50	1.01
Ser	237	A	T	.	.	1.92	-0.61	*	.	F	2.20	1.21
His	238	A	T	.	.	1.61	-0.61	*	.	F	2.16	1.77
Ile	239	A	T	.	.	1.31	-0.51	*	.	.	1.77	1.66
Lys	240	A	1.58	-0.56	*	.	F	1.88	1.66
Arg	241	A	1.79	-0.44	*	.	F	1.84	1.66
Thr	242	1.79	-0.94	*	.	F	2.60	4.09
Ser	243	C	1.23	-1.24	*	.	F	2.34	2.74
His	244	C	1.73	-0.74	*	.	F	2.08	1.41
Glu	245	A	C	1.30	-0.31	.	.	.	1.17	1.25
Ser	246	A	0.80	-0.37	.	.	.	0.91	1.19
Ala	247	A	0.72	-0.33	.	.	.	0.65	1.12

この点で非常に好ましいフラグメントの中には、いくつかの構造特徴（例えば、上記に示されるいくつかの特徴）と組合わせたスタニオカルシンの領域を含むフラグメントがある。

【0087】

他の好ましいフラグメントは、生物学的に活性なスタニオカルシンフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、スタニオカルシンポリペプチドの活性に類似した（必ずしも同一である必要はない）活性を示すフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性としては、改善された所望の活性、または減少した所望されない活性が挙げられ得る。

【0088】

（エピトープ保有部分）

別の局面において、本発明は、本発明のポリペプチドのエピトープ保有部分を
含むペプチドおよびポリペプチドを提供する。これらのエピトープは、本発明の
ポリペプチドの免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープである。「免疫原性
エピトープ」は、本発明のポリペプチド全体またはそのフラグメントが免疫原で
ある場合、インビボで抗体応答を誘発するタンパク質の一部と定義される。他方
、抗体が結合し得るポリペプチドの領域は、「抗原決定基」または「抗原性エピ
トープ」と定義される。タンパク質のインビボ免疫原性エピトープの数は、一般
に、抗原性エピトープの数よりも少ない(例えば、Geysenら、Proc .
Nat l . Acad . Sci . USA 81 : 3998 - 4002 (1983)
を参照のこと)。しかし、抗体は、ファージディスプレイのような方法を用いる
ことによって、そのエピトープが免疫原性エピトープであるか否かに関わらず、任
意の抗原性エピトープに対して作製され得る(例えば、Petersenら、M
ol . Gen . Genet . 249 : 425 - 31 (1995)を参照のこと)
。従って、免疫原性エピトープおよび抗原性エピトープの両方が、本発明に含ま
れる。

【0089】

免疫原性エピトープを含む例示されたアミノ酸配列のリストは、上記の表Iに
記載される。表1が、JamesonおよびWolf(1988)Comp . A
ppl . Biosci . 4 : 181 - 186(この参考文献は、その全体が参考
として援用される)のアルゴリズムを使用して、最も高度な抗原性を有すると予
測されるエピトープを含むアミノ酸残基のみを列挙することに留意する。このJ
ameson - Wolf抗原性分析は、デフォルトパラメーターを使用する、コ
ンピュータープログラムPROTEAN(Version 3.11 for P
ower Macintosh , DNASTAR , Inc . , 1228 Sou
th Park Street Madison , WI)を使用して実行された。
表1および表1に列挙されないポリペプチドの部分は、非免疫原性とはみなさ
れない。表1の免疫原性エピトープは、例示されたリストであり、排他的リスト
ではない。なぜなら、他の免疫原性エピトープは、使用された特定のアルゴリズム
によって、このように単に認識されないだけであるからである。他の免疫原性

エピトープを含むアミノ酸残基は、Jameson-Wolf分析に類似のアルゴリズムを使用して、または当該分野で公知の方法を使用して抗原性応答についてインビボで試験することによって、慣用的に決定され得る。例えば、Geysenら、前出；米国特許第4,708,781号；同第5,194,392号；同第4,433,092号；および同第5,480,971号（これらの参考文献は、それらの全体が参考として本明細書中に援用される）を参照のこと。

【0090】

本発明の抗原性エピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列内に含まれる、好ましくは少なくとも7個、より好ましくは少なくとも9個、および最も好ましくは約15～約30個の間のアミノ酸の配列を含む。スタニオカルシン特異的抗体に対して使用され得る非限定的な抗原性ポリペプチドまたはペプチドの例としては、おおよそスタニオカルシン由来の、配列番号2のアミノ酸残基を含むポリペプチドが挙げられる。これらのポリペプチドフラグメントは、図3に示されるように、上記のJameson-Wolf抗原性指数の分析によって、スタニオカルシタンパク質の抗原性エピトープを保有することが決定された。

【0091】

表1のアミノ酸配列が、免疫原性エピトープを含むことを特に留意する。表1は、Jameson-Wolf分析によって決定される免疫原性エピトープの重要な残基のみを列挙する。従って、N末端、C末端、またはN末端およびC末端の両方のいずれかの上のさらなる隣接残基は、表1の配列に付加され、本発明のエピトープ保有ポリペプチドを生成し得る。従って、表1の免疫原性エピトープは、さらなるN末端アミノ酸残基またはC末端アミノ酸残基を含み得る。さらなる隣接アミノ酸残基は、本発明のポリペプチド由来の連続する隣接N末端配列および/またはC末端配列、異種ポリペプチド配列であり得るか、または本発明のポリペプチド由来の連続する隣接配列および異種ポリペプチド配列の両方を含み得る。

【0092】

免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む本発明のポリペプチドは、

少なくとも7アミノ酸残基長である。「少なくとも」とは、免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む本発明のポリペプチドが、7アミノ酸残基長であり得るか、または7アミノ酸と本発明の全長ポリペプチドのアミノ酸残基数との間の任意の整数であり得ることを意味する。免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む好ましいポリペプチドは、少なくとも、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100アミノ酸残基長である。しかし、7と全長ポリペプチドのアミノ酸残基数との間の各整数および全ての整数が、本発明に含まれることに留意する。

【0093】

免疫エピトープ保有フラグメントおよび抗原性エピトープ保有フラグメントは、上記に記載のように、連続するアミノ酸残基数に特定され得るか、または配列番号2のアミノ酸配列上のこれらのフラグメントのN末端位置およびC末端位置によってさらに特定されるかのいずれかであり得る。例えば、少なくとも7または少なくとも15の連続するアミノ酸残基長のフラグメントが、配列番号2のアミノ酸配列を占有し得るN末端位置およびC末端位置の全ての組み合わせが、本発明に含まれる。さらに、「少なくとも7つの連続するアミノ酸残基長」とは、7アミノ酸残基長、または7アミノ酸と本発明の全長ポリペプチドのアミノ酸残基数との間の任意の整数を意味する。詳細には、7と全長ポリペプチドのアミノ酸残基数との間の各整数および全ての整数が、本発明に含まれる。

【0094】

本発明の免疫原性エピトープ保有ポリペプチドおよび抗原性エピトープ保有ポリペプチドは、例えば、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を作製するため、およびイムノアッセイにおいて本発明のポリペプチドを検出するために有用である。抗体は、例えば、本発明のポリペプチドのアフィニティー精製において有用である。抗体はまた、当該分野で公知の方法を使用する本発明のポリペプチドに特異的な、種々の定性的または定量的イムノアッセイにおいて慣用的に使用され得る。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor La

boratory Press ; 第2版、1988)を参照のこと。

【0095】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野で公知の合成方法および組換え方法を含むポリペプチドを作製するための、任意の従来的手段によって生成され得る。例えば、エピトープ保有ペプチドは、公知の化学合成方法を使用して合成され得る。例えば、Houghtenは、多数のペプチド(例えば、HA1ポリペプチドのセグメントの単一のアミノ酸改変体を提示する、10~20mgの、248の別々の、そして13残基の異なるペプチド)の合成のための単純な方法を記載し、これらの全てのペプチドは、4週間未満で調製および特徴付けられる(ELISA型結合研究によって)(Houghten, R. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135(1985))。この「Simultaneous Multiple Peptide Synthesis (SMPS)」プロセスは、さらに、Houghtenおよび共同研究者(1986)の米国特許第4,631,211号に記載されている。この手順において、種々のペプチドの固相合成のための個々の樹脂は、別々の溶媒透過性パッケージに含まれ、固相法に関連する多くの同一の反復工程の最適な使用を可能にする。完全な手動手順は、500~1000以上の合成が同時に実行されるのを可能にする(HoughtenらProc. Natl. Acad. Sci. 82:5131-5135の5134(1985))。

【0096】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドを使用して、インビボ免疫、インビトロ免疫、およびファージディスプレイ法を含むが、これらに限定されない当該分野で周知の方法に従って、抗体を誘導する。例えば、Sutcliffeら、前出;Wilsonら、前出;Bittleら、J. Gen. Virol. 66:2347-2354(1985)を参照のこと。インビボ免疫化を使用する場合、動物を遊離のペプチドで免疫し得るが;しかし、抗ペプチド抗体力価は、高分子キャリア(例えば、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)または破傷風トキソイド)にこのペプチドを結合させることによってブーストされ得る。例えば、システイン残基を含むペプチドは、-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロ

キシスクシンイミドエステル(MBS)のようなリンカーを使用してキャリアに結合され得、一方、他のペプチドは、グルタルアルデヒドのようなより一般的な連結剤を使用してキャリアに結合され得る。動物(例えば、ウサギ、ラットおよびマウス)は、遊離ペプチドまたはキャリア結合ペプチドのいずれかで、例えば、約100 μ gのペプチドまたはキャリアタンパク質、およびFreund's アジュバントを含むエマルジョンの腹腔内注射および/または皮内注射によって免疫される。例えば、約2週間間隔での、数回の追加免疫注射が、例えば、固体表面に吸着された遊離ペプチドを使用するELISAアッセイによって検出され得る、有用な力価の抗ペプチド抗体を提供するために必要とされ得る。免疫化された動物由来の血清中の抗ペプチド抗体の力価は、例えば、当該分野で周知の方法に従う固体支持体上のペプチドへの吸着および選択された抗体の溶出による、抗ペプチド抗体の選択によって増加され得る。

【0097】

当業者は、免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む本発明のポリペプチドは、異種ポリペプチド配列に融合され得ることを理解し、そして上記される。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン(IgA、IgE、IgG、IgM)の定常ドメインまたはその部分(CH1、CH2、CH3、ドメイン全体およびその部分の両方を含むこれらの任意の組み合わせ)と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。非限定の別の例として、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(これらのフラグメントまたは改変体を含む)は、アルブミン(組換えヒト血清アルブミンまたはそのフラグメントもしくは改変体を含むが、これらに限定されない(例えば、米国特許第5,876,969号(1999年3月2日発行)、EP特許0413622号、および米国特許第5,766,883号(1998年6月16日発行)(これらは、その全体が参考として本明細書中に援用される)を参照のこと))に融合され得る。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(これらのフラグメントまたは改変体を含む)は、ヒト血清アルブミンの成熟形態(すなわち、EP特許0322094(これは、その全体が参考として本明細書中に援用される)の図1および2に示されるように、ヒト血清アルブミンのアミノ酸1~585)と融

合される。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(これらのフラグメントまたは改変体を含む)は、米国特許第5,766,883号(本明細書中にその全体が参考として援用される)に記載されるように、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1-z(ここで、zは、369~419の整数である)を含むか、あるいはこれからなるポリペプチドフラグメントと融合される。本発明のポリペプチドおよび/または抗体(これらのフラグメントまたは改変体を含む)は、異種タンパク質(例えば、免疫グロブリンFcポリペプチドまたはヒト血清アルブミンポリペプチド)のN末端またはC末端のいずれかに、融合され得る。本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドがまた、本発明によって含まれる。

【0098】

上記のような融合タンパク質は、精製を容易にし得、そしてインビボでの半減期を増加し得る。これは、例えば、ヒトCD4ポリペプチドの第1の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている。例えば、EPA0,394,827; Traunckerら(1988) Nature 331:84-86を参照のこと。IgG部分に起因するジスルフィド連結二量体構造を有する融合タンパク質はまた、単量体ポリペプチドまたはそのフラグメント単独よりも、他の分子を結合および中和する際により効率的であり得る。例えば、Fountoulakisら(1995) J. Biochem. 270:3958-3964を参照のこと。上記エピトープをコードする核酸はまた、発現されたポリペプチドの検出および精製を補助するために、エピトープタグとして目的の遺伝子と組換えられ得る。

【0099】

(抗体)

さらに、本発明のポリペプチドは、特異的抗体-抗原結合をアッセイするための当該分野で周知の免疫アッセイによって決定されるように、本発明のスタニオカルシン(stanniocalcin)ポリペプチド、ポリペプチドフラグメントまたは改変体(例えば、配列番号2のアミノ酸配列のポリペプチドまた

はフラグメントまたは改変体、あるいは、本発明の寄託されたプラスミドに含まれるcDNAによってコードされるポリペプチドおよび/またはエピトープ)に免疫特異的に結合する抗体およびT細胞抗原レセプター(TCR)に関する。本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体もしくはキメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって産生されたフラグメント、抗イデオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、細胞内作製された抗体(すなわち、イントラボディー)、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分(すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子)をいう。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)、またはサブクラスであり得る。好ましい実施形態において、本発明の免疫グロブリン分子は、IgG1である。他の好ましい実施形態において、本発明の免疫グロブリン分子は、IgG4である。

【0100】

最も好ましくは、この抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体フラグメントであり、これには、Fab、Fab'およびF(ab')₂、Fd、単鎖Fvs(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、ならびにVLドメインまたはVHドメインのいずれかを含むフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。単鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を単独で、または以下の全体もしくは部分と組み合わせて含み得る：ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメイン。また、可変領域とヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインとの任意の組み合わせもまた含む抗原結合フラグメントがまた、本発明に含まれる。本発明の抗体は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源由来であり得る。好ましくは、この抗体は、ヒト、ネズミ(例えば、マウスおよびラット)、ロバ、シップウサギ(s

hip rabbit)、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。本明細書中で使用される場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、そしてヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体、または1つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックでありそして内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体(下に記載のように、そして例えば、Kucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号において記載のような)を含む。

【0101】

本発明の抗体は、一重特異的、二重特異的、三重特異的またはより多くの多重特異性の抗体であり得る。多重特異的な抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であり得るか、または本発明のポリペプチドおよび異種のエピトープ(例えば、異種ポリペプチドもしくは固体支持体物質)の両方に特異的であり得る。例えば、PCT公開WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tuttleら、J. Immunol. 147:60-69(1991); 米国特許第4,474,893号; 同第4,714,681号; 同第4,925,648号; 同第5,573,920号; 同第5,601,819号; Kostelnyら、J. Immunol. 148:1547-1553(1992)を参照のこと。

【0102】

本発明の抗体は、これらが認識または特異的結合する、本発明のポリペプチドのエピトープまたは部分に関して、記載または特定化され得る。このエピトープまたはポリペプチドの部分は、例えば、N末端およびC末端位置によって、連続するアミノ酸残基におけるサイズによって、本明細書中に記載されるように特定化され得る。本発明の任意のエピトープまたはポリペプチドに特異的に結合する抗体はまた、排除され得る。従って、本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に結合する抗体を含み、そして本発明のポリペプチドの排除を可能にする。

【0103】

本発明の抗体はまた、その交差反応性について記載または特定化され得る。本発明のポリペプチドの任意の他のアナログ、オルソログまたはホモログを結合し

ない抗体が、含まれる。本発明のポリペプチドに対して少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%および少なくとも50%の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書中に記載される方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドを結合する抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトタンパク質のマウス、ラットおよび/またはウサギホモログ、ならびに対応するこれらのフラグメントと交差反応する。本発明のポリペプチドに対して95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満および50%未満の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書中に記載される方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドを結合しない抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、上記の交差反応性は、本明細書中に開示された、任意の単一特異的な抗原性または免疫原性ポリペプチド、あるいは2、3、4、5以上の特異的抗原性および/または免疫原性ポリペプチドの組み合わせに関する。さらに本発明には、（本明細書中に記載されるような）ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを結合する抗体が含まれる。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドに対するその結合親和性によって記載または特定され得る。好ましい結合親和性としては、 5×10^{-2} M未満、 10^{-2} M未満、 5×10^{-3} M未満、 10^{-3} M未満、 5×10^{-4} M未満、 10^{-4} M未満、 5×10^{-5} M未満、 10^{-5} M未満、 5×10^{-6} M未満、 10^{-6} M未満、 5×10^{-7} M未満、 10^{-7} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満、 5×10^{-9} M未満、 10^{-9} M未満、 5×10^{-10} M未満、 10^{-10} M未満、 5×10^{-11} M未満、 10^{-11} M未満、 5×10^{-12} M未満、 10^{-12} M未満、 5×10^{-13} M未満、 10^{-13} M未満、 5×10^{-14} M未満、 10^{-14} M未満、 5×10^{-15} M未満および 10^{-15} M未満の解離定数すなわちKdを有する親和性が挙げられる。

【0104】

本発明はまた、競合性結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法（例

例えば、本明細書中で記載されるイムノアッセイ)によって決定されるような、本発明のエピトープに対する抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。好ましい実施形態において、この抗体は、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%、エピトープへの結合を競合的に阻害する。

【0105】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る。例えば、本発明は、本発明のポリペプチドとのレセプター/リガンド相互作用を部分的または完全にのいずれかで破壊する抗体を含む。好ましくは、本発明の抗体は、本明細書中に開示される抗原性エピトープまたはその部分に結合する。本発明は、レセプター特異的抗体およびリガンド特異的抗体の両方の特徴を有する。本発明はまた、リガンド結合を妨害しないがレセプター活性化を妨害する、レセプター特異的抗体の特徴を有する。レセプター活性化(すなわち、シグナル伝達)は、本明細書中に記載の技術、そうでなければ、当該分野で公知の技術により決定され得る。例えば、レセプター活性化は、免疫沈降それに続くウェスタンブロット分析(例えば、上記のような)によってレセプターまたはその基質のリン酸化(例えば、チロシンまたはセリン/トレオニン)を検出することにより、決定され得る。特定の実施形態において、この抗体の非存在下で、リガンド活性またはレセプター活性を、その活性の少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%を阻害する抗体が提供される。

【0106】

本発明はまた、リガンド結合およびレセプター活性化の両方を妨げるレセプター特異的抗体、ならびにレセプター-リガンド複合体を認識しそして好ましくは、結合していないレセプターまたは結合していないリガンドを特異的に認識はしない抗体の特徴を有する。同様に、本発明は、リガンドと結合しそしてレセプターへのリガンドの結合を妨げる中和抗体、およびリガントと結合しそれによりレ

セプター活性化を妨げるがリガンドがレセプターを結合することを妨げない抗体を含む。さらに、本発明は、レセプターを活性化する抗体を含む。これらの抗体は、レセプターアゴニストとして作用し得、すなわち、リガンド媒介レセプター活性化の生物学的活性化の全てまたはサブセットのいずれかを、例えば、レセプターの二量体化を誘導することによって増強するかまたは活性化し得る。この抗体は、本明細書中に開示される本発明のペプチドの特定の生物学的活性を含む生物学的活性についての、アゴニスト、アンタゴニストまたは逆アゴニストとして特定化され得る。上記抗体アゴニストは、当該分野で公知の方法を用いて作製され得る。例えば、PCT公開WO96/40281；米国特許第5,811,097号；Dengら、Blood 92(6)：1981-1988(1998)；Chenら、Cancer Res. 58(16)：3668-3678(1998)；Harropら、J. Immunol. 161(4)：1786-1794(1998)；Zhuら、Cancer Res. 58(15)：3209-3214(1998)；Yoonら、J. Immunol. 160(7)：3170-3179(1998)；Pratら、J. Cell. Sci. 111(Pt 2)：237-247(1998)；Pitardら、J. Immunol. Methods 205(2)：177-190(1997)；Liautardら、Cytokine 9(4)：233-241(1997)；Carlsonら、J. Biol. Chem. 272(17)：11295-11301(1997)；Tarymanら、Neuron 14(4)：755-762(1995)；Mullerら、Structure 6(9)：1153-1167(1998)；Bartunekら、Cytokine 8(1)：14-20(1996)(これらは全て、その全体が参考として本明細書中に援用される)を参照のこと。

【0107】

本発明の抗体は、例えば、本発明のポリペプチドを精製し、検出し、そして標的化するために使用され得る(インビトロおよびインビボの両方での診断方法および治療方法を含む)。例えば、この抗体は、生物学的サンプルにおける本発明のポリペプチドのレベルを定性的におよび定量的に測定するためのイムノアッセ

イにおける用途を有する。例えば、Harlowら, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988) (本明細書中でその全体が参照として援用される) を参照のこと。

【0108】

以下により詳細に議論するように、本発明の抗体は、単独でかまたは他の化合物との組み合わせでのいずれかで使用され得る。この抗体はさらに、N末端もしくはC末端で異種ポリペプチドに組換え的に融合され得るか、またはポリペプチドもしくは他の化合物へ化学的に結合(共有結合および非共有結合を含む)され得る。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子、および異種ポリペプチド、薬剤、放射性核種、または毒素のようなエフェクター分子に、組換え的に融合または結合され得る。例えば、PCT公開WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; 米国特許第5,314,995号; および欧州特許第396,387号(これらの開示は、その全体が参考として本明細書中に援用される) を参照のこと。

【0109】

本発明の抗体は、改変された(すなわち、抗体が抗イディオタイプ応答を生成するのを妨げないような、抗体への任意の型の分子の共有結合による)誘導体を含む。例えば、制限されないが、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化(pegylation)、リン酸化(phosphorylation)、アミド化、既知の保護基/ブロック基(blocking group)による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって改変された、抗体が挙げられる。多数の任意の化学的改変が、特異的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むが、これらに制限されない公知の技術によって実行され得る。さらに、この誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。

【0110】

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法によって産生され得る。目的の抗原に対するポリクローナル抗体は、当該分野で周知の種々の手順によっ

て産生され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、種々の宿主動物（ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない）に投与されて、抗原に対して特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導し得る。種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を増加させるために使用され得、そしてこれにはフロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG（カルメット-ゲラン桿菌）および*Corynebacterium parvum*のような潜在的に有用なヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない。このようなアジュバントはまた、当該分野で周知である。

【0111】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む、当該分野で公知の広範な種々の技術を用いて調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、当該分野で公知の以下に挙げられるハイブリドーマ技術を使用して産生され得、例えば、Harlowら、*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版、1988); Hammerlingら、*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y. 1981) (上記の参考文献は、その全体が参考として援用される)に教示される。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ技術を通して生成された抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」とは、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体をいい、そしてモノクローナル抗体が生成される方法ではない。

【0112】

ハイブリドーマ技術を用いて特定の抗体を産生およびスクリーニングする方法は、慣用的であり、そして当該分野に周知であり、そして実施例に詳細に議論さ

れる。非限定の例として、マウスは、本発明のポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現する細胞を用いて免疫され得る。一旦免疫応答が検出される（例えば、抗原に特異的な抗体がマウスの血清中に検出される）と、マウスの脾臓を収集しそして脾細胞を単離する。次に、脾細胞を周知の技術によって任意の適切なメラノーマ細胞（例えば、ATCCから入手可能な細胞株SP20由来の細胞）に融合させる。ハイブリドーマを限定希釈によって選択およびクローン化する。次に、ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌する細胞について当該分野で公知の方法によってアッセイする。一般的に高いレベルの抗体を含む腹水が、陽性ハイブリドーマクローンをを用いてマウスを免疫させることによって、産生され得る。

【0113】

従って、本発明は、モノクローナル抗体および本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程を包含する方法によって産生される抗体を、産生する方法を提供し、ここで、好ましくは、このハイブリドーマは、骨髓腫細胞を用いた本発明の抗原と免疫させたマウスから単離された脾細胞とを融合させることによって、次いで本発明のポリペプチドと結合し得る抗体を分泌するハイブリドーマクローンについての融合物から生じるハイブリドーマをスクリーニングすることによって産生される。

【0114】

ポリクローナルおよびモノクローナルヒトB細胞株の両方を産生するための別の周知の方法は、エプスタイン - バーウイルス (EBV) を用いたトランスフォーメーションである。EBVトランスフォームされたB細胞株を作製するためのプロトコールは、当該分野で一般的に公知である（例えば、*Current Protocols in Immunology*, Coliganら、編、1994、John Wiley & Sons, NYの第7.22章に概略されるプロトコール（これは、本明細書中に参考としてその全体が本明細書によって援用される）など）。トランスフォーメーションのためのB細胞の供給源は、通常、ヒト末梢血であるが、トランスフォーメーションのためのB細胞はまた、リンパ節、扁桃、脾臓、腫瘍組織および感染組織を含むがこれらに限定されない他の

供給源から誘導され得る。組織は、一般的に、EBVトランスフォーメーションの前に、単一細胞懸濁液にされる。さらに、B細胞含有サンプルにおいて、T細胞を物理的に取り除くかまたはT細胞を不活性化する（例えば、シクロスポリンAを用いた処理によって）かのいずれかのための工程がとられ得る。なぜなら、抗EBV抗体に対してセロポジティブな個体由来のT細胞は、EBVによるB細胞不死化を抑制し得るからである。

【0115】

概して、ヒトB細胞を含むサンプルは、EBVで接種され、そして3～4週間培養される。EBVの代表的な供給源は、B95-8細胞株（ATCC番号VR-1492）の培養上清である。EBVトランスフォーメーションの物理的なしるしは、一般的に、3～4週間の培養期間の最後にむかって見出され得る。位相差顕微鏡によると、トランスフォームされた細胞は、大きく、はっきりとし、毛様であり、そして詰まった細胞のクラスターに凝集する傾向があるようである。最初に、EBV株は、一般的にポリクローン化される。しかし、延長された細胞培養期間にわたって、EBV株は、特定のB細胞クローンの選択的な副産物の結果としてモノクローナルまたはポリクローナルになり得る。あるいは、ポリクローナルEBVトランスフォーム株は、（例えば、限定希釈培養によって）サブクローン化され得るか、または適切な融合パートナーに融合されて限定希釈でプレートに播かれ、モノクローナルB細胞株を生じる。EBVトランスフォーム細胞株に適切な融合パートナーとしては、マウス骨髄腫細胞株（例えば、SP2/0、X63-Ag8.653）、ヘテロ骨髄腫細胞株（ヒト×マウス；例えば、SPAM-8、SBC-H20、およびCB-F7）、およびヒト細胞株（例えば、GM1500、SKO-007、RPMI 8226、およびKR-4）が挙げられる。従って、本発明はまた、ヒトB細胞のEBVトランスフォーメーションを含む、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントに対する、ポリクローナルヒト抗体またはモノクローナルヒト抗体を作製する方法を提供する。

【0116】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって生成され得る。例えば、本発明のFabおよびF(ab')₂フラグメントは、(Fab

bフラグメントを生成するために)パパインまたは(F(ab')₂フラグメントを生成するために)ペプシンのような酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって産生され得る。F(ab')₂フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のCH1ドメインを含む。

【0117】

例えば、本発明の抗体はまた、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ方法を用いて産生され得る。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特定の実施形態において、そのようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用され得る。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて選択または同定され得る(例えば、標識した抗体あるいは固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原を使用する)。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、ファージ遺伝子IIIタンパク質またはファージ遺伝子VIIタンパク質のいずれかに組換え的に融合されたFab、Fvまたはジスルフィド安定化されたFvの抗体ドメインを有するファージから発現されたfdおよびM13結合ドメインを含む糸状ファージ(filamentous phage)である。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられる: Brinkmanら、J. Immunol. Methods 182:41-50(1995); Amesら、J. Immunol. Methods 184:177-186(1995); Kettleboroughら、Eur. J. Immunol. 24:952-958(1994); Persicら、Gene 187:9-18(1997); Burtonら、Advances in Immunology 57:191-280(1994); PCT出願番号PCT/GB91/01134; PCT公開WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; ならびに米国特許第5,698,426号; 同第

5, 223, 409号; 同第5, 403, 484号; 同第5, 580, 717号; 同第5, 427, 908号; 同第5, 750, 753号; 同第5, 821, 047号; 同第5, 571, 698号; 同第5, 427, 908号; 同第5, 516, 637号; 同第5, 780, 225号; 同第5, 658, 727号; 同第5, 733, 743号および同第5, 969, 108号(これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

【0118】

上記参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体をコードする領域は、ヒト抗体を含む抗体の全体または任意の他の所望の抗原結合フラグメントを生成するために単離されかつ用いられ得、そして例えば、以下に詳細が記載されるように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主において発現され得る。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントを組換え的に産生するための技術はまた、当該分野で公知の方法を用いて使用され得、このような方法は、以下に開示される: PCT公開WO 92/22324; Mullinaxら、BioTechniques 12(6):864-869(1992); およびSawaiら、AJRI 34:26-34(1995); およびBetterら、Science 240:1041-1043(1998)(これらの参考文献は、その全体が参考として援用される)。

【0119】

単鎖のFvsおよび抗体を産生するために用いられ得る技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号; Hustonら、Methods in Enzymology 203:46-88(1991); Shuら、PNAS 90:7995-7999(1993); およびSkerraら、Science 240:1038-1040(1988)に記載される技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボにおける使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の使用が好ましくあり得る。キメラ抗体とは、抗体の異なる部分が、異なる動物種に由来する分子(例えば、マウスモノクローナル抗体由来の

可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体)である。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野において公知である。例えば、Morrisson, Science 229:1202(1985); Oira, BioTechniques 4:214(1986); Gilliesら、(1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; 米国特許第5,807,715号; 同第4,816,567号; および同第4,816,397号を参照のこと(これらはそれらの全体が、参考として本明細書中に援用される)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望された抗原に結合する非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基(framework residue)は、抗原結合を変化させるため(好ましくは改善させるために)CDRドナー抗体由来の対応残基と置換される。これらフレームワークの置換は、当該分野で周知の方法によって同定され、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較による。(例えば、Queenら、米国特許第5,585,089号; Riechmannら、Nature 332:323(1988)を参照のこと(これらはそれらの全体が参考として本明細書中に援用される))。抗体は、以下を含む当該分野で公知の種々の技術を用いてヒト化され得る: 例えば、CDR-移植(欧州特許第239,400号; PCT公開WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号; 同第5,530,101号および同第5,585,089号)、ベニヤリング(veneering)またはリサーフェイシング(resurfacing)(欧州特許第592,106号; 同第519,596号; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991); Studnickaら、Protein Engineering 7(6):805-814(1994); Roguskaら、PNAS 91:969-973(1994))、およびチェーンシャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)。

【0120】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に対して特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法を含む当該分野で公知の種々の方法により作製され得る。米国特許第4,444,887号、同第4,716,111号；およびPCT公開WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、およびWO 91/10741；（これらの各々はその全体が参考として本明細書中に援用される）もまた参照のこと。

【0121】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンの発現は出来ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子およびヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体は、無作為にまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域 (diversity region) は、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン座の導入と別々にまたは同時に非機能的にされ得る。特に、JH領域のホモ接合性の欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。改変された胚性幹細胞を増殖させ、そしてキメラマウスを産生するために胚盤胞中に微量注入する。次いで、キメラマウスを、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を産生するために繁殖させる。トランスジェニックマウスを、選択された抗原（例えば、本発明のポリペプチドの全体または部分）を用いて通常の様式で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて免疫したトランスジェニックマウスから得られ得る。トランスジェニックマウスに保持されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、そしてその後、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。従って、そのような技術の使用によって、治療的に有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体の産生が可能である。ヒト抗体を産

生するためのこの技術の概要については、LonbergおよびHuszar (1995、Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術のならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な議論については、例えば、PCT公開WO98/24893; WO92/01047; WO96/34096; WO96/33735; 欧州特許第05980877号米国特許第5,413,923号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,569,825号; 同第5,661,016号; 同第5,545,806号; 同第5,814,318号; 同第5,885,793号; 同第5,9116,771号; および同第5,939,598号; 同第6,075,181号ならびに同第6,114,598号を参照のこと(これらはその全体が本明細書中に参考として援用される)。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) およびGenpharm (San Jose, CA) のような企業は、上記の技術に類似した技術を用いて選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事し得る。

【0122】

選択されたエピトープを完全に認識するヒト抗体を、「ガイドされた(guided)選択」といわれる技術を用いて産生し得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体(例えば、マウス抗体)は、同じエピトープを完全に認識するヒト抗体の選択を導くために使用される。(Jespersら、Bio/technology 12:899-903(1988))。

【0123】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、当業者に周知の技術を用いて本発明のポリペプチドを「模倣する」抗イディオタイプ抗体を産生するために順々に利用され得る。(例えば、GreenspanおよびBona、FASEB J. 7(5):437-444;(1989)およびNissinoff, J. Immunol. 147(8):2429-2438(1991)を参照のこと。)例えば、本発明のポリペプチドに結合し、そして本発明のポリペプチドの多量体化(multimerization)および/またはリガンドに対する

本発明のポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体が、ポリペプチドの多量体化ドメインおよび/または結合ドメインを「模倣する」抗イディオタイプを産生するために使用され得、そして結果としてポリペプチドおよび/またはそのリガンドに結合し、そして中和する。このような抗イディオタイプまたはそのような抗イディオタイプのFabフラグメントの中和は、ポリペプチドリガンド/レセプターを中和するための治療的レジメンに使用され得る。例えば、そのような抗イディオタイプ抗体は、本発明のポリペプチドに結合するためおよび/またはそのリガンド/レセプターに結合するために使用され得、そしてそれによってその生物学的活性がブロックされる。あるいは、ポリペプチド多量体化および/もしくは結合、ならびに/またはレセプター/リガンド多量体化、結合および/もしくはシグナル伝達に結合してそして増強する抗体は、本発明のポリペプチドのアゴニスト、および/またはそのリガンド/レセプターとして機能する抗イディオタイプを生成するために使用され得る。このようなアゴニスト性抗イディオタイプまたはこのような抗イディオタイプのFabフラグメントは、治療レジメンにおいて、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはそのリガンド/レセプターとして使用され得る。例えば、このような抗イディオタイプ抗体は、本発明のポリペプチドを結合するためおよび/またはこのリガンド/レセプターを結合するために使用され得、そしてこれにより、その生物学的活性を促進または増強させる。

【0124】

本発明のイントラボディー (intrabody) は、例えば、Chenら, Hum. Gene Ther. 5: 595 - 601 (1994); Marasco, W. A., Gene Ther. 4: 11 - 15 (1997); Rondon and Marasco, Annu. Rev. Microbiol. 51: 257 - 283 (1997); Probaら, J. Mol. Biol. 275: 245 - 253 (1998); Cohenら, Oncogene 17: 2445 - 2456 (1998); OhageおよびSteipe, J. Mol. Biol. 291: 1119 - 1128 (1999); Ohageら, J. Mol. Biol. 291: 1129 - 1134 (1999); WirtzおよびSte

ipe, Protein Sci. 8:2245-2250(1999); Zhur, J. Immunol. Methods 231:207-222(1999)ならびにそこに引用される参考文献において開示されそして概説される、当該分野で公知の方法を使用して生成され得る。

【0125】

(抗体をコードするポリヌクレオチド)

本発明はさらに、本発明の抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ストリンジェントな、または低いストリジェンシーのハイブリダイゼーション条件下で(例えば、本明細書中で定義されるような)抗体(好ましくは、本発明のポリペプチドと特異的に結合する、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび/または寄託されたプラスミドに含まれるcDNAによりコードされるポリペプチドに結合する抗体)をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【0126】

ポリヌクレオチドが、当該分野で公知の任意の方法によって得られ得、そしてポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定される。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られている場合、抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから集められ得(例えば、Kutmeierら、BioTechniques 17:242(1994)に記載されるような)、これは、簡単にいうと、以下の工程を包含する:抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、次いでPCRによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅。

【0127】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源からの核酸から作製され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成されるかまたは適切な供給源(例えば、抗体cDNAライブラリー

、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から作製されたcDNAライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリA+RNA）を、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために、配列の3'末端もしくは5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得られ得る。PCRによって作製された増幅された核酸は、次いで、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

【0128】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えDNA技術、部位指向性変異誘発、PCRなど（例えば、Sambrookら、1990、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY およびAusubelら編、1998、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および/または挿入を生成するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を作製し得る。

【0129】

特定の実施形態において、重鎖および/または軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域(CDR)の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって（例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖、および軽鎖の可変領域を既知のアミノ酸配列と比較することによって）調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に（例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレー

ムワーク領域中に)挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在する領域、またはコンセンサスフレームワーク領域、および好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る(例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothiaら、*J. Mol. Biol.* 278:457-479(1998)を参照のこと)。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって作製されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内のジスルフィド結合が欠如した抗体分子を作製するように、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

【0130】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによる、「キメラ抗体」を生産するために発達した技術(Morrisonら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855(1984); Neubergerら、*Nature* 312:604-608(1984); Takedaら、*Nature* 314:452-454(1985))が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種から誘導される分子であり、このような分子は、マウスmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域から由来の可変領域を有する(例えば、ヒト化抗体)。

【0131】

あるいは、単鎖抗体の産生のために記載された技術(米国特許第4,946,778号; Bird、*Science* 242:423-42(1988); Hustonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883(1988); およびWardら、*Nature* 334:544-54(1989))が、単鎖抗体の産生に適応され得る。単鎖抗体は、Fv領

域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る(Skerraら、Science 242:1038-1041(1988))。

【0132】

(抗体を産生する方法)

本発明の抗体は、抗体を合成するための当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、または、好ましくは、組換え体発現技術によって産生され得る。抗体を生成するための方法は、ハイブリドーマ技術、EBV形質転換および本明細書中に開示される他の方法、ならびに以下に記載されるような組換えDNA技術の使用を介する方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0133】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ(例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体)の組換え体発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分(好ましくは、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する)をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって産生され得る。従って、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法には、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結した、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域(例えば、PCT公開WO86/05807; PCT公開WO89/01036; および米国特許第5,122,464号

を参照のこと)をコードするヌクレオチド配列ならびに重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る抗体の可変ドメインを含み得る。

【0134】

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、そしてこのトランスフェクトされた細胞は、次いで、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結した、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子の全体の発現のために宿主細胞において同時発現され得る。

【0135】

種々の宿主発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現させるために利用され得る。このような宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、かつ続いて精製され得るビヒクルを表わすが、また、適切なヌクレオチドをコードする配列で形質転換またはトランスフェクトされる場合に、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を表わす。これらには、抗体をコードする配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNAの発現ベクターを用いて形質転換された細菌(例えば、E. coli、B. サブチリス(subtilis))のような微生物;抗体をコードする配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、Saccharomyces、Pichia);抗体をコードする配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系;組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)に感染した植物細胞系または抗体をコードする配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系;あるいは哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)または哺乳動物のウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイル

ス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、*Escherichia coli*のような細菌細胞、そしてより好ましくは、特に、組換え抗体分子全体の発現のために真核生物細胞が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要最初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わせられた、チャイニーズハムスターの卵巣細胞（CHO）のような哺乳動物細胞が、抗体のための効果的な発現系である（Foeckingら、*Gene* 45:101（1986）；Cockettら、*Bio/Technology* 8:2（1990））。

【0136】

細菌系において、多くの発現ベクターが、抗体分子の発現を意図する使用に依存して有利に選択され得る。例えば、多量のこのようなタンパク質が産生されるべき場合、抗体分子の薬学組成物の作製のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指向するベクターが所望され得る。このようなベクターには、抗体をコードする配列がlacZをコードする領域と共にベクターにインフレームで個別に連結され得、その結果、融合タンパク質が産生される*E. coli*発現ベクターpUR278（Rutherら、*EMBO J.* 2:1791（1983））；pINベクター（Inouye&Inouye、*Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109（1985）；Van Heeke&Schuster、*J. Biol. Chem.* 24:5503-5509（1989））などが挙げられるが、これらに限定されない。pGEXベクターもまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として、外因性ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、そして溶解した細胞から、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合、それに続く遊離グルタチオン存在化での溶出によって容易に精製され得る。このpGEXベクターは、トロンピンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、このクローニングされた標的遺伝子産物は、GST部分から放出され得る

。

【0137】

昆虫系において、オートグラフィカリフォルニカ核多核体病ウイルス (Autographa Californica nuclear polyhedrosis virus) (AcNPV) は、外因性遺伝子を発現させるためのベクターとして使用される。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞中で増殖する。この抗体をコードする配列は、ウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン (polyhedrin) 遺伝子) に個々にクローニングされ得、そしてAcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置され得る。

【0138】

哺乳動物の宿主細胞において、多くのウイルスに基づいた発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、抗体をコードする目的の配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体 (例えば、後期プロモーターおよび3部からなるリーダー配列) に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボの組換えによって、アデノウイルスゲノム中に挿入され得る。ウイルスのゲノムの非必須領域 (例えば、領域E1またはE3) への挿入は、感染した宿主において生存し、かつ抗体分子を発現し得る組換えウイルスを生じる。(例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984) を参照のこと)。特定の開始シグナルもまた、挿入された抗体をコードする配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、この開始コドンは、挿入物全体の翻訳を保証するように、所望のコード配列のリーディングフレームと同調でなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の種々の起源のであり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって増大され得る (Bittnerら、Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987) を参照のこと)。

【0139】

さらに、挿入された配列の発現を調節するか、または遺伝子産物を所望の特定の様式に改変およびプロセスする宿主細胞株が、選択され得る。タンパク質産物のこのような改変（例えば、グリコシル化）およびプロセッシング（例えば、切断）は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質産物および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび改変について特徴的かつ特有の機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現した外因性タンパク質の正確な改変およびプロセッシングを保証するように選択され得る。この目的のために、一次転写物の適切なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化、およびリン酸化のための細胞の機構を有する真核生物の宿主細胞が使用され得る。このような哺乳動物の宿主細胞には、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、および、特に、乳癌細胞株（例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47Dなど）、ならびに正常な乳腺細胞株（例えば、CRL7030およびHs578Bstなど）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0140】

組換えタンパク質の長期の高収率の産生のために、安定した発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現する細胞株が操作され得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターの使用よりも、むしろ宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）、および選択マーカーによって制御されるDNAで形質転換され得る。外因性DNAの導入に続いて、操作された細胞は、濃縮された培地中で1～2日間増殖され得、次いで選択培地に切り換えられる。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択への耐性を与え、そして細胞がプラスミドをそれらの染色体に安定に組み込むことを可能とし、そして増殖し、次いで細胞株にクローニングおよび増殖され得る病巣を形成する。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために有利に使用され得る。このような操作された細胞株は、抗体分子と直接的または間接的に相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において特に有用であり得る。

【0141】

多くの選択系が使用され得、それらには、それぞれ tk -、hgprt -、または aprt - の細胞において使用され得る、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら、Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalskaおよび Szybalski、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992))、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら、Cell 22:817 (1980)) 遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子の選択の基礎として使用され得る：メトトレキサートへの耐性を与える dhfr (Wiglerら、Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980)；O'Hareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981))；ミコフェノール酸への耐性を与える gpt (Mulliganおよび Berg、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981))；アミノグリコシド G-418 への耐性を与える neo (Clinical Pharmacy 12:488-505；WuおよびWu、Biotherapy 3:87-95 (1991)；Tolstoshev、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993)；Mulligan、Science 260:926-932 (1993)；ならびにMorganおよびAnderson、Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993)；1993年5月、TIB TECH 11(5):155-215)；ならびにハイグロマイシンへの耐性を与える hygro (Santerreら、Gene 30:147 (1984))。当該分野で一般に公知である組換えDNA技術の方法は、Ausubelら (編)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)；Kriegler、Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)；ならびにDracopolisら (編)、Current Prot

ocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994) の12および13章; Colberre-Garapinら、J. Mol. Biol. 150:1 (1981) に記載され、これらはその全体が本明細書において参考として援用される。

【0142】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加され得る(総説については、BebbingtonおよびHentschel、The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, 第3巻(Academic Press, New York, 1987を参照のこと)。抗体を発現するベクター系においてマーカーが増幅できる場合、宿主細胞の培養液中に存在するインヒビターのレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加する。この増幅された領域が抗体遺伝子と結合しているために、この抗体の産生もまた、増加する(Crouseら、Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983))。

【0143】

選択マーカーとしてグルタミンシンターゼ(GS)またはDHFRを使用するベクターは、各々、薬物メチオニンスルホキシミン(sulphoximine)またはメトトレキサートの存在下で増幅され得る。グルタミンシンターゼベースのベクターの利点は、細胞株(例えば、マウス骨髄腫細胞株(NS0))のアベイラビリティであり、これは、グルタミンシンターゼネガティブである。グルタミンシンターゼ発現系はまた、内因性遺伝子の官能化を促進するためのさらなるインヒビターを提供することにより、グルタミンシンターゼ発現細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞)において機能し得る。グルタミンシンターゼ発現系およびその成分は、PCT公報:WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; およびWO91/06657に詳細され、これらは、本明細書中で参考としてその全体が援用さえる。さらに、本発明に従って使用され得るグルタミンシンターゼ発現

ベクターは、供給者 (supplier) (例えば、Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH) が挙げられる) から市販されている。マウス骨髄腫細胞におけるGS発現系を使用するモノクローナル抗体の発現および産生は、Bebbingtonら, Bio/technology 10:169 (1992) ならびにBibliaおよびRobinson Biotechnol. Prog. 11:1 (1995) に記載され、これらは、本明細書中で参考としてその全体が援用される。

【0144】

その宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター (重鎖由来のポリペプチドをコードする第1のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第2のベクター) で同時トランスフェクトされ得る。この2つのベクターは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの等しい発現を可能とする同一の選択マーカールを含み得る。あるいは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの両方をコードする単一のベクターが使用され得る。このような状況において、この軽鎖は、過剰の有毒な遊離重鎖を避けるために、重鎖の前に配置されるべきである (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980))。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

【0145】

一旦、本発明の抗体分子が、組換え発現によって産生されると、この抗体分子は、免疫グロブリン分子の精製についての当該分野で公知の任意の方法によって (例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティー (特にタンパク質Aの後の特異的抗原へのアフィニティーによる) クロマトグラフィー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差示的溶解度によって、またはタンパク質の精製についての他の任意の標準的な技術によって) 精製され得る。

【0146】

本発明は、融合タンパク質を作製するために、本発明のポリペプチド (またはそれらの一部、好ましくは、ポリペプチドの少なくとも10、20、30、40

、50、60、70、80、90または100個のアミノ酸)と組換え的に融合したか、あるいは化学的に結合(共有結合および非共有結合の両方を含む)した抗体を含む。この融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。この抗体は、本発明のポリペプチド(またはそれらの一部、好ましくは、ポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90または100個のアミノ酸)以外の抗原に特異的であり得る。例えば、抗体は、本発明のポリペプチドを、インビトロまたはインビボのいずれかで、特定の細胞表面レセプターに特異的な抗体に融合させるかまたは結合させることによって、本発明のポリペプチドを特定の細胞型に標的化するために使用され得る。本発明のポリペプチドに融合されたかまたは結合された抗体はまた、当該分野で公知の方法を使用してインビトロ免疫アッセイおよび精製方法にて使用され得る。例えば、Harborら、前出およびPCT公開WO 93/21232; EP 439,095; Naramuraら、Immunol. Lett. 39:91-99(1994); 米国特許第5,474,981号; Gilliesら、PNAS 89:1428-1432(1992); Fellら、J. Immunol. 146:2446-2452(1991)(これらは、それらの全体において参考として援用される)を参照のこと。

【0147】

本発明はさらに、可変領域以外の抗体のドメインに融合されたかまたは結合された本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のFc領域、あるいはその一部に融合または結合され得る。本発明のポリペプチドに融合された抗体部分は、定常領域、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、あるいはそれらのドメイン全体または部分の任意の組合せを含み得る。このポリペプチドはまた、上記の抗体部分に融合または結合し、マルチマーを形成し得る。例えば、本発明のポリペプチドと融合したFc部分は、Fc部分間のジスルフィド結合を介して二量体を形成し得る。より高次のマルチマー形態は、このポリペプチドをIgAおよびIgMの部分に融合することにより作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合するための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第

5, 336, 603号; 同第5, 622, 929号; 同第5, 359, 046号; 同第5, 349, 053号; 同第5, 447, 851号; 同第5, 112, 946号; EP 307, 434; EP 367, 166; PCT公開WO 96/04388; WO 91/06570; Ashkenaziら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539(1991); Zhengら、J. Immunol. 154:5590-5600(1995); および Vilら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341(1992)(上記の参考文献は、それらの全体が参考として援用される)を参照のこと。

【0148】

上記で議論されたように、本発明のポリペプチドは、上記の抗体部分と融合または結合され得、このポリペプチドのインビボの半減期を増加するか、または当該分野で公知の方法を使用するイムノアッセイにおいて使用される。さらに、配列番号2に対応するポリペプチドは、精製を容易にするために、上記の抗体部分に融合または結合され得る。1つの報告された実施例は、ヒトCD4ポリペプチドの第1の2つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンの重鎖もしくは軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載する。EP 394, 827; Trauneckerら、Nature 331:84-86(1988)を参照のこと。ジスルフィド連結した二量体構造(IgGに起因する)を有する抗体に融合または結合した本発明のポリペプチドはまた、単量体分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子との結合および中和においてより効率的であり得る。(Fountoulakisら、J. Biochem. 270:3958-3964(1995))。多くの場合において、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断において有利であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る。例えば、EP A 232, 262。あるいは、融合タンパク質が発現、検出、および精製された後のFc部分の欠損は、好ましい。例えば、この融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、このFc部分は、治療および診断を妨げ得る。薬物の開発において、例えば、ヒトタンパク質(例えばhIL-5)は、hIL-5のアンタゴ

ニストを同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイの目的のために、Fcタンパク質と融合された。(D. Bennettら、J. Molecular Recognition 8:52-58(1995); Johansonら、J. Biol. Chem. 270:9459-9471(1995)を参照のこと)。

【0149】

さらに、本発明の抗体またはそれらのフラグメントは、精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列と融合され得る。好ましい実施形態において、このマーカーアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター(QIAGEN、Inc.、9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)において提供されるタグのようなヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、それらの多くは市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ(Wilsonら、Cell 37:767(1984))および「flag」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

【0150】

本発明はさらに、診断剤、または治療剤に結合する抗体またはそのフラグメントを含む。この抗体は、例えば、臨床試験の手順の一部(例えば、所定の治療レジムの有効性を決定するための)として、腫瘍の発生または進行をモニターするために診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングすることによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子射出断層撮影法を使用する陽電子射出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。本発明に従う診断薬として使用するための抗体に結合され得る金属イオンとしては、例えば、米国特許第4,741,900号を参照のこと。

【0151】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、治療用部分(例えば細胞毒(例えば

細胞増殖抑制性もしくは細胞殺傷性の薬剤)、治療剤または放射性金属イオン(例えば、 α -エミッタ(例えば ^{213}Bi)など)に結合され得る。細胞毒または細胞毒性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。例としては、パクリタキセル(paclitaxol)、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン(colchicin)、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン(dihydroxy anthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそのアナログまたはホモログ、が挙げられる。治療剤は、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン(5-fluorouracil decarbazine)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパ(thioepa)クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アンスラサイクリン(例えば、ダウノルピシン(以前はダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアンスラマイシン(anthracyclin)(AMC))、ならびに抗有糸分裂剤(例えばピンクリスチンおよびビンブラスチン)、を含むが、それらに限定されない。

【0152】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を改変するために使用され得、治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、毒素(例えばアブリン、リシ

ンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素) ; タンパク質 (例えば、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経発育因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス薬 (例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM I (国際公開第WO97/33899号を参照のこと)、AIM II (国際公開第WO97/34911号を参照のこと)、Fasリガンド (Takahashiら、Int. Immunol. 6 : 1567 - 1574 (1994))、VEGI (国際公開第WO99/23105号を参照のこと))、血栓症薬もしくは抗脈管形成薬 (例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン) ; または生物学的応答改変剤 (例えばリンホカイン、インターロイキン-1 (「IL-1」)、インターロイキン-2 (「IL-2」)、インターロイキン-6 (「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G-CSF」)、または他の増殖因子など)、が挙げられ得る。

【0153】

抗体はまた、固体支持体に付着させられ得、この固体支持体は、標的抗原の免疫アッセイまたは精製に特に有用である。このような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレン、が挙げられるがそれらに限定されない。

【0154】

このような治療部分を抗体に結合する技術は周知であり、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら (編)、243 - 56頁 (Alan R. Liss, Inc. 1985) ; Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」Controlled Drug Delivery (第2版)、Robinsonら (編)、623 - 53頁 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Can

cer Therapy: A Review」Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら(編)、475-506頁(1985); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら(編)、303-16頁(Academic Press 1985)、およびThorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev. 62: 119-58(1982)を参照のこと。

【0155】

あるいは、抗体は2次抗体に結合され、米国特許第4,676,980号(これは、その全体が本明細書に参考として援用される)におけるSegalによる記載のような抗体異種結合体(heteroconjugate)を形成し得る。

【0156】

単独、あるいは細胞毒性因子および/またはサイトカインと組み合わせて投与される、抗体に結合する治療部分を有するかまたは有さない抗体が、治療薬として使用され得る。

【0157】

(免疫表現型分類(immunophenotyping))

本発明の抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の翻訳生成物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および/または成熟の種々の段階で差示的に発現される細胞マーカーとして有用であり得る。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して指向されるモノクローナル抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発

現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクローナル抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス（すなわち、プレート）に付着した抗体を用いる「パンニング」、ならびにフローサイトメトリー（例えば、米国特許第5,985,660号；およびMorrisonら、Cell, 96:737-49(1999)を参照のこと）が挙げられる。

【0158】

これらの技術は、血液学的悪性腫瘍（すなわち、急性白血病患者における最少残留疾患（minimal residual disease）（MRD））および対宿主性移植片病（GVHD）を予防するための移植術における「非自己」細胞と共に見出され得るような、細胞の特定集団のスクリーニングを可能にする。あるいは、これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような増殖および/または分化を受け得る、造血幹細胞および先祖細胞のスクリーニングを可能にする。

【0159】

（抗体結合についてのアッセイ）

本発明の抗体は、当該分野において公知の任意の方法により、免疫特異的結合についてアッセイされ得る。用いられ得る免疫アッセイとしては、いくつかのものについてだけ名称を挙げると、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイのような技術を用いる競合アッセイ系および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。このようなアッセイは慣用的であり、そして当該分野において周知である（例えば、その全体が本明細書中に参考として援用される、Ausubelら編, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第1巻, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照のこと）。例示的な免疫アッセイが、以下に簡潔に記載される（が、これらは限定を目的とすることが意図

されない)。

【0160】

免疫沈降プロトコルは、一般に、タンパク質ホスファターゼインヒビターおよび/またはプロテアーゼインヒビター(例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジン酸ナトリウム)を補充したRIPA緩衝液(1% NP-40またはTriton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム(pH7.2)、1% Trasylol)のような溶解緩衝液中で、細胞の集団を溶解する工程、目的の抗体を細胞溶解物に添加する工程、一定時間(例えば、1~4時間)4でインキュベートする工程、プロテインAセファロースビーズおよび/またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解物に添加する工程、約1時間以上4でインキュベートする工程、溶解緩衝液中でビーズを洗浄する工程、およびSDS/サンプル緩衝液中でビーズを再懸濁する工程を包含する。目的の抗体の、特定の抗原を免疫沈降する能力は、例えば、ウエスタンブロット分析により、アッセイされ得る。当業者は、抗体の抗原への結合を増加するように、そしてバックグラウンドを減少させるように改変され得るパラメータ(例えば、セファロースビーズを用いて細胞溶解物を事前にきれいにする工程)に関して、認め得る。免疫沈降プロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編、1994、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、John Wiley & Sons、Inc.、New York、10.16.1を参照のこと。

【0161】

ウエスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製する工程、ポリアクリルアミドゲル(例えば、抗原の分子量に応じた8%~20% SDS-PAGE)中でのそのタンパク質サンプルの電気泳動、そのタンパク質サンプルをそのポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、PVDFまたはナイロンのような膜に移す工程、ブロッキング溶液(例えば、3% BSAまたは脱脂粉乳を有するPBS)中でその膜をブロックする工程、洗浄緩衝液(例えば、PBS-Tween 20)中でその膜を洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希

積された一次抗体（目的の抗体）を用いてその膜をブロックする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希釈された酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）あるいは放射性分子（例えば、 ^{32}P または ^{125}I ）に結合した二次抗体（一次抗体を認識する、例えば、抗ヒト抗体）を用いて、その膜をブロックする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ならびにその抗原の存在を検出する工程を包含する。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように、そしてバックグラウンドノイズを減少させるように改変され得るパラメータに関して、認め得る。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology，第1巻、John Wiley & Sons，Inc.，New York，10.8.1を参照のこと。

【0162】

ELISAは、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルをその抗原でコーティングする工程、酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のような検出可能な化合物に結合した目的の抗体をそのウェルに添加し、そして一定時間インキュベートする工程、およびその抗原の存在を検出する工程を包含する。ELISAにおいて、目的の抗体は、検出可能な化合物に結合している必要はない；その代わりに、検出可能な化合物に結合した第二の抗体（目的の抗体を認識する）が、ウェルに添加され得る。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルにコーティングされ得る。この場合、検出可能な化合物に結合した第二の抗体が、コーティングされたウェルへの目的の抗原の添加に続いて、添加され得る。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように改変され得るパラメータ、および当該分野において公知のELISAの他のバリエーションに関して、認め得る。ELISAに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology，第1巻、John Wiley & Sons，Inc.，New York，11.2.1を参照のこと。

【0163】

抗原に対する抗体の結合親和性および抗体 - 抗原相互作用のオフレート (off-rate) が、競合結合アッセイにより決定され得る。競合結合アッセイの一つの例は、ラジオイムノアッセイであり、ラジオイムノアッセイは、標識抗原 (例えば、 ^3H または ^{125}I) と、漸増量の非標識抗原の存在下での、目的の抗体を用いるインキュベーション、および標識抗原に結合した抗体の検出を含む。特定の抗原に対する目的の抗体の親和性、および結合オフレートは、スキャッチャードプロット分析によるデータから決定され得る。第二の抗体との競合はまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定され得る。この場合、抗原は、漸増量の非標識の第二の抗体の存在下で、標識化合物 (例えば、 ^3H または ^{125}I) に結合した目的の抗体とともにインキュベートされる。

【0164】

(治療用途)

本発明はさらに、抗体ベースの治療に関し、この治療は、1つ以上の開示された疾患、障害、または状態を処置するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトの患者に、本発明の抗体を投与する工程を包含する。本発明の治療化合物としては、本発明の抗体 (本明細書中に記載されるような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む) ならびに本発明の抗体をコードする核酸 (本明細書中に記載されるような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体ならびに抗イディオタイプ抗体を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患、障害または状態 (本明細書中に記載される任意の1つ以上の疾患、障害、または状態を含むがこれらに限定されない) を処置、阻害または予防するために使用され得る。本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患、障害または状態の処置および/または予防は、それらの疾患、障害または状態に関連した症状を緩和する工程を含むが、これに限定されない。本発明の抗体は、当該分野で公知であるか、または本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

【0165】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の要約は、身体内で局所的にまたは全身的に、あるいは（例えば、補体（CDC）により、またはエフェクター細胞（ADCC）により媒介されるような）抗体の直接的細胞傷害性により、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを結合させることを含む。これらのアプローチのいくつかは、より詳細に以下に記載される。本明細書中で提供される教示を与えられれば、当業者は、過度の実験なしに、診断上の目的、モニタリングの目的あるいは治療上の目的のために、本発明の抗体を使用する方法がわかる。

【0166】

本発明の抗体は、例えば、抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増加させるために役立つ、他のモノクローナル抗体またはキメラ抗体、あるいはリンホカインまたは造血増殖因子（例えば、IL-2、IL-3およびIL-7のような）と組み合わせて有利に利用され得る。

【0167】

本発明の抗体は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン治療、免疫治療および抗腫瘍剤）との組み合わせで投与され得る。一般的に、（抗体の場合には）患者の種と同じ種である種起源または種反応性の生成物の投与が好ましい。従って、好ましい実施形態においては、ヒトの抗体、フラグメント誘導體、アナログ、または核酸が、治療または予防のために、ヒトの患者に投与される。

【0168】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に関する免疫アッセイ、およびそれらに関連した障害の治療の両方のために、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する、高親和性および/または強力な、インビボでの阻害抗体および/または中和抗体、それらのフラグメント、またはそれらの領域を使用することが好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に対して親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M

M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、および 10^{-15} Mより小さい解離定数すなわちKdを有する結合親和性が挙げられる。

【0169】

(遺伝子治療)

特定の実施形態において、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現したか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

【0170】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明に従って使用され得る。例示的な方法が以下に記載される。

【0171】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら、*Clinical Pharmacy* 12:488-505(1993);WuおよびWu、*Biotherapy* 3:87-95(1991);Tolstoshev、*Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.*32:573-596(1993);Mulligan、*Science* 260:926-932(1993);ならびにMorganおよびAnderson、*Ann.Rev.Biochem.*62:191-217(1993);May、*TIBTECH* 11(5):155-215(1993)を参照のこと。使用され得る、組換えDNA技術分野において一般的に公知である方法は、Ausubelら(編)、*Current Protocols in Molecular Biology*、John Wiley&Sons、NY(1993);およびKriegler、*Gene Transfer and Expression*、A Laboratory Manual、Stockton Press

, NY (1990) に記載される。

【0172】

好ましい実施形態において、化合物は抗体をコードする核酸配列を含有し、上記核酸配列は、適切な宿主において、抗体、またはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質、あるいはその重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域に作動可能に連結したプロモーターを有し、上記プロモーターは誘導性であるかまたは構成性であり、そして必要に応じて組織特異的である。別の特定の実施形態においては、抗体をコードする配列および任意の他の所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接した核酸分子が使用され、従って抗体をコードする核酸の染色体内の発現を提供する (Koller および Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932 - 8935 (1989); Zijlstra, Nature 342: 435 - 438 (1989))。特定の実施形態において、発現した抗体分子は単鎖抗体であるか；あるいはこの核酸配列は、この抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする配列またはそのフラグメントを含む。

【0173】

核酸の患者への送達は、直接的 (この場合、患者は核酸または核酸保有ベクターに直接的に曝される) か、または間接的 (この場合、細胞は最初にインビトロで核酸で形質転換され、次いで患者に移植される) のいずれかであり得る。これらの2つのアプローチは、インビボ遺伝子治療として、またはエキソビボ遺伝子治療としてそれぞれ公知である。

【0174】

特定の実施形態において、核酸配列はインビボで直接的に投与され、そこで核酸配列は発現されて、コードされた生成物を産生する。これは、当該分野で公知の多数の方法 (例えば、それらを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれを (例えば、欠損性または弱毒化したレトロウイルスまたは他のウイルスベクター (米国特許第4,980,286号を参照のこと) を用いる感染により) 細胞内になるように投与することにより、あるいは、裸のDNAの直接

注射により、あるいは、微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic、Dupont）の使用により、あるいは脂質または細胞表面のレセプターでコーティングするか、もしくは薬剤をトランスフェクトすることにより、あるいは、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中へのカプセル化により、あるいは、それらを核に入ることが公知であるペプチドと結合させて投与することにより、レセプター媒介のエンドサイトーシスを受けるリガンドと結合させて投与することにより（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)を参照のこと）（レセプターを特異的に発現する細胞の型を標的にするために用いられ得る）などのいずれかにより達成され得る。別の実施形態において、核酸-リガンド複合体が形成され得、ここで、このリガンドはエンドソームを破壊するフソジェニック（fusogenic）ウイルス性ペプチドを含み、この核酸がリソゾーム分解を回避することを可能にする。さらに別の実施形態において、核酸は、特定のレセプターを標的化することにより、細胞特異的な取り込みおよび発現についてインビボで標的化され得る（例えば、PCT公開第WO92/06180号；同第WO92/22635号；同第WO92/20316号；同第WO93/14188号、同第WO93/20221号を参照のこと）。あるいは、核酸は、細胞内部に導入され得、そして相同組換えにより、発現のために宿主細胞DNA中に組み込まれ得る（KollerおよびSmithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989)；Zijlstraら, Nature 342:435-438 (1989)）。

【0175】

特定の実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る（Millerら, Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)を参照のこと）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルス性ゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの正確な組込みのために必要な構成要素を含む。遺伝子治療において使用される抗体をコードする核酸配列は、一つ以上のベクター中にクローニングされ、これは、患者内への遺伝子の送達を容易に

する。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、Boesenら, *Biotherapy* 6:291-302(1994)(これは、幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、mdr1遺伝子を造血性幹細胞に送達するための、レトロウイルスベクターの使用を記載する)に見出され得る。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献は、以下である: Clowesら, *J. Clin. Invest.* 93:644-651(1994); Kiemら, *Blood* 83:1467-1473(1994); SalmonsおよびGunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141(1993); ならびにGrossmanおよびWilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114(1993)。

【0176】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、特に、気道上皮へ遺伝子を送達するための魅力的なナビクルである。アデノウイルスは、自然に気道上皮に感染し、そこで軽い疾患を起こす。アデノウイルスベースの送達システムの他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞を感染することができるという利点を有する。KozarskyおよびWilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503(1993)は、アデノウイルスベースの遺伝子治療の概説を示す。Boutら, *Human Gene Therapy* 5:3-10(1994)は、アカゲザルの気道上皮に遺伝子に移すためのアデノウイルスベクターの使用を示した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeldら, *Science* 252:431-434(1991); Rosenfeldら, *Cell* 68:143-155(1992); Mastrangeliら, *J. Clin. Invest.* 91:225-234(1993); PCT公開第WO94/12649号; およびWangら, *Gene Therapy* 2:775-783(1995)に見出され得る。好ましい実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。

【0177】

アデノ随伴ウイルス(AAV)はまた、遺伝子治療における使用が提案されてきた(Walshら, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300(1993); 米国特許第5,436,146号)。

【0178】

遺伝子治療への別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法により、組織培養中の細胞へ遺伝子を移入する工程を包含する。通常、移入の方法は、選択可能なマーカーの細胞への移入を含む。次いで、細胞は、移入された遺伝子を取り込みそして発現する細胞を単離するために選沢下に置かれる。次いで、それらの細胞は患者に送達される。

【0179】

この実施形態においては、得られた組換え細胞のインピボ投与の前に、核酸が細胞に導入される。このような導入は、当該分野において公知の任意の方法により実施され得、それらの方法としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介の遺伝子移入、マイクロセル媒介の遺伝子移入、スフェロプラスト融合など。外来遺伝子の細胞への導入については、当該分野において多数の技術が公知であり(例えば、LoefflerおよびBehr, Meth. Enzymol. 217: 599-618(1993); Cohenら, Meth. Enzymol. 217: 618-644(1993); Cline, Pharmac. Ther. 29: 69-92m(1985)を参照のこと)、そしてレシピエント細胞の必要な発生的および生理学的機能が破壊されないならば、本発明に従って使用され得る。この技術は、細胞への核酸の安定した移入を提供すべきであり、その結果、この核酸は、細胞により発現可能であり、好ましくは、その細胞の子孫により遺伝性でかつ発現可能である。

【0180】

得られた組換え細胞は、当該分野において公知の様々な方法により、患者へ送

達され得る。組換え血球（例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞）は、好ましくは、静脈内に投与される。使用が考えられる細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者により決定され得る。

【0181】

遺伝子治療の目的のために核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の入手可能な細胞型を包含し、以下を含むがそれらに限定されない：上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血球；様々な幹細胞または前駆細胞、特に、造血幹細胞または造血前駆細胞（例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児の肝臓などから得られるような細胞）。

【0182】

好ましい実施形態において、遺伝子治療に使用される細胞は、患者に対して自己である。

【0183】

遺伝子治療において組換え細胞が使用される実施形態において、抗体をコードする核酸配列は、細胞またはそれらの子孫により核酸配列が発現可能であるように細胞に導入され、そして次いで組み換え細胞は、治療的效果のためにインピボで投与される。具体的な実施形態において、幹細胞または前駆細胞が用いられる。インピトロで単離され得、そしてインピトロで維持され得る任意の幹細胞および/または前駆細胞は、本発明のこの実施形態に従って潜在的に使用され得る（例えば、PCT公開第WO94/08598号：StempleおよびAnderson, Cell 71:973-985(1992)；Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229(1980)；ならびにPittelkowおよびScott, Mayo Clinic Proc. 61:771(1986)を参照のこと）。

【0184】

特定の実施形態において、遺伝子治療の目的で導入されるべき核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含有し、その結果、核酸の発現は、適切な転写誘導因子の存在または不在を制御することにより制御可能であ

る。

【0185】

(治療活性または予防活性の証明)

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、そして次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の、治療有用性または予防有用性を証明するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および/または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術(ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない)を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるか否かを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養物において増殖し、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

【0186】

(治療的/予防的な投与および組成物)

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物、好ましくは本発明のポリペプチドまたは抗体の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製される(例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質は実質的にない)。被験体は好ましくは、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない動物であり、そして好ましくは哺乳動物であり、そして最も好ましくはヒトである。

【0187】

化合物が核酸または免疫グロブリンを含む場合に使用され得る処方および投与方法は、上記に記載され;さらなる適切な処方および投与経路は、本明細書中で以下に記載されたものの中から選択され得る。

【0188】

様々な送達システムが公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る（例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、この化合物の発現が可能な組換え細胞中でのカプセル化、レセプター媒介エンドサイトーシス（例えば、WuおよびWu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)を参照のこと）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など）。導入方法としては、皮内、筋肉、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられるがそれらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路により（例えば、注入またはボラス注射により、上皮または粘膜内層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を通しての吸収により）投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的化合物または組成物を、任意の適切な経路（脳室内注射および髄腔内注射を包含し；脳室内注射は、例えば、Ommayaリザーバのようなりザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る）により中枢神経系に導入することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアゾール化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

【0189】

特定の実施形態において、本発明の薬学的化合物または組成物を、処置の必要な領域に局所的に投与することが望まれ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせ）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラスティック（*silastic*）膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、または膠様材料である）により達成され得る。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する際、タンパク質が吸収されない材料を使用するために注意が払われなければならない。

【0190】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リポソーム中へ送達され得る（Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990)；Treatら, *Liposomes in the Therap*

y of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler(編), Liss, New York, 353~365頁(1989); Lopez-Berestein, 同書317~327頁を参照のこと; 広く同書を参照のこと)。

【0191】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は制御された放出システム中で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る(Langer, (前出); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwaldら, Surgery 88:507(1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574(1989)を参照のこと)。別の実施形態において、高分子材料が用いられ得る(Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise(編), CRC Press., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall(編), Wiley, New York(1984); RangerおよびPeppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61(1983)を参照のこと; Levyら, Science 228:190(1985); Duringら, Ann. Neurol. 25:351(1989); Howardら, J. Neurosurg. 71:105(1989)もまた参照のこと)。さらに別の実施形態において、制御された放出システムは、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、全身用量の一部のみを必要とする(例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, (前出), 第2巻, 115~138頁(1984)を参照のこと)。

【0192】

他の制御された放出システムは、Langerにより総説において議論される(Science 249:1527-1533(1990))。

【0193】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である、特定の実施形態において、その核酸は、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構成し、そしてそれが細胞内になるように投与することにより（例えば、レトロウイルスベクターの使用により（米国特許第4,980,286号を参照のこと）、または直接注射により、または微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont）の使用により、または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト剤でコーティングすることにより、または核に入ることが公知であるホメオボックス様ペプチドと結合させて投与すること（例えば、Joliotら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991)を参照のこと）などにより、そのコードされたタンパク質の発現を促進するようにインビボで投与され得る。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして、発現のために相同組換えにより宿主細胞DNA内に組み込まれ得る。

【0194】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の化合物、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。具体的な実施形態において、用語「薬学的に受容可能な」とは、動物における、そしてさらに特にヒトにおける使用のために、連邦規制当局もしくは米国政府により認められたか、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に列挙されたことを意味する。用語「キャリア」とは、治療剤とともに投与される、希釈剤、アジュバンド、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような薬学的なキャリアは、水および油（石油起源、動物起源、植物起源、または合成起源の油（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など）を含む）のような滅菌した液体であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に、好ましいキャリアである。生理食塩水溶液、ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液はまた、特に注射可能な溶液のために、液体キャリアとして使用され得る。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、イネ、フラワー、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン

酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物はまた、所望されるならば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含み得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出処方物などの形態を取り得る。この組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドのようなキャリアとともに、坐剤として処方され得る。経口処方物は、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準キャリアを含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。このような組成物は、治療有効量の化合物を、好ましくは精製された形態で、適切な量のキャリアとともに含んで、患者への適切な投与のための形態を提供する。処方物は、投与形態に適すべきである。

【0195】

好ましい実施形態において、組成物は、慣用手順に従って、ヒトへの静脈内投与のために採用された薬学的組成物として、処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射の部位での痛みを緩和するリグノカインのような局部麻酔を含み得る。一般的には、成分は、別々にかまたは単一投薬形態と一緒に混合してのどちらかで、例えば、一定量の活性薬剤を示すアンプルまたは小袋(sachette)のような密封された容器中の凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。組成物が注入により投与されるべき場合には、組成物は、滅菌した薬学的等級の水または生理食塩水を含む注入ボトルに分配され得る。組成物が注射により投与される場合、成分が投与の前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【0196】

本発明の化合物は、中性のまたは塩の形態として処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもののようなアニオンとともに形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモ

ニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののようなカチオンとともに形成される塩が挙げられる。

【0197】

この処置（本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性と関連する疾患または障害の抑制および予防）において効果的である本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術により決定され得る。さらに、インビトロアッセイは、必要に応じて、使用して最適な投薬量の範囲を同定するのを助け得る。処方において使用されるべき正確な用量はまた、投与の経路、および疾患または障害の重篤さに依存し、そして開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿され得る。

【0198】

抗体に関して、患者に投与される投薬量は、代表的に、患者の体重1kgあたり0.1mg~100mgである。好ましくは、患者に投与される投薬量は、患者の体重1kgあたり0.1mgと20mgとの間であり、より好ましくは、患者の体重1kgあたり1mg~10mgである。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドへの免疫応答に起因して、他種由来の抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。従って、ヒト抗体の低い投薬量および頻度の低い投与は、しばしば可能である。さらに、本発明の抗体の投与の投薬量および頻度は、改変（例えば、脂溶化（lipidation）のような）による抗体の取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を増強することにより減少され得る。

【0199】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の一つ以上の成分で満たされている一つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形式における通告は、このような容器に、必要に応じて伴ない得る。この通告は、ヒトの投与のための製造、使用または販売のこの機関による認可を反映する。

【0200】

(診断および画像化)

目的のポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体、ならびにその誘導体およびそのアナログは、診断目的のために使用されて、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連する疾患、障害および/または状態を検出、診断またはモニターし得る。本発明は、目的のポリペプチドの異常な発現の検出を提供し、これは、(a) 目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および(b) この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、異常な発現を示す。

【0201】

本発明は、障害(例えば、神経障害)を診断するための診断アッセイを提供し、このアッセイは、(a) 目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および(b) この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、特定の障害を示す。癌に関して、個体由来の生検組織における比較的高い量の転写物の存在は、疾患の発生についての素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前に疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家に予防手段を使用させること、またはより早期の積極的な処置を可能にし得、これにより、癌の発生またはさらなる進行を予防する。

【0202】

本発明の抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイに使用し得る(例えば、Jalkanenら、J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanenら、J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)を参照のこと)。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ(例えば、酵素結合免疫吸

着アッセイ (E L I S A) および放射免疫アッセイ (R I A) が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識 (例えば、グルコースオキシダーゼ) ; 放射性同位体 (例えば、ヨウ素 (1 2 5 I 、 1 2 1 I) 、炭素 (1 4 C) 、硫黄 (3 5 S) 、トリチウム (3 H) 、インジウム (1 1 2 I n) 、およびテクネチウム (9 9 T c)) ; 発光標識 (例えば、ルミノール) ; ならびに蛍光標識 (例えば、フルオレセインおよびローダミン) 、ならびにビオチンが挙げられる。

【 0 2 0 3 】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおける、目的のポリペプチドの異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。本発明の好ましい実施形態は、動物 (好ましくは、哺乳動物、最も好ましくはヒト) における本発明のポリペプチドの異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。1つの実施形態において、診断は、a) 目的のポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識化分子を被験体に (例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に) 投与する工程 ; b) このポリペプチドが発現する被験体内の部位でこの標識化分子が優先的に濃縮することを可能にするために (および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために) 投与後、時間間隔を待つ工程 ; c) バックグラウンドレベルを決定する工程 ; および d) この被験体中の標識化分子を検出する工程、を包含し、その結果、このバックグラウンドレベルを越える標識化分子の検出は、この被験体が目的のポリペプチドの異常な発現と関連する特定の疾患または障害を有することを示す。バックグラウンドレベルは、特定の系について以前に決定された標準的な値と、検出された標識化分子の量を比較する工程を包含する種々の方法により決定され得る。

【 0 2 0 4 】

被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、約 5 ~ 2 0 ミリキュリーの 9 9 m T c の範囲である。次いで、標識された抗体または抗

体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、S.W.Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments」(Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancerの第13章、S.W.BurchielおよびB.A.Rhodes編、Masson Publishing Inc.(1982))に記載される。

【0205】

用いられる標識の型および投与の様式を含む、いくつかの可変要素に依存して、標識された分子が被験体の部位に優先的に濃縮し、そして結合されていない標識された分子がバックグラウンドレベルまで一掃されることを可能にする、投与後の時間間隔は、6～48時間または6～24時間または6～12時間である。別の実施形態においては、投与後の時間間隔は、5～20日間または5～10日間である。

【0206】

1つの実施形態においては、疾患または障害のモニタリングは、その疾患または障害を診断するための方法を繰り返すこと(例えば、最初の診断後1ヶ月、最初の診断後6ヶ月、最初の診断後1年など)により行われる。

【0207】

標識された分子の存在は、インビボ走査について当該分野において公知の方法を用いて、患者から検出され得る。これらの方法は、用いられる標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を検出するための適切な方法を決定し得る。本発明の診断方法において用いられ得る方法およびデバイスとしては、限定はされないが、コンピューター断層撮影(CT)、陽子(position)射出断層撮影法(PET)のような全身走査、磁気共鳴画像法(MRI)、および超音波検査法が挙げられる。

【0208】

特定の実施形態においては、この分子は放射性同位体で標識され、そして放射

線応答性の外科用機器を用いて患者から検出される (Thurstonら、米国特許第5,441,050号)。別の実施形態においては、この分子は蛍光化合物で標識され、そして蛍光応答性の走査機器を用いて患者から検出される。別の実施形態においては、この分子は陽電子射出金属で標識され、そして陽子射出断層撮影法を用いて患者 (patient) から検出される。さらに別の実施形態においては、この分子は常磁性標識で標識され、そして磁気共鳴画像法 (MRI) を用いて患者から検出される。

【0209】

(キット)

本発明は、上記の方法において使用され得るキットを提供する。1つの実施形態において、キットは、1つ以上の容器において、本発明の抗体、好ましくは精製した抗体を備える。特定の実施形態において、本発明のキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチドを備える。このエピトープは、キット中に含まれる抗体と特異的に免疫反応する。好ましくは、本発明のキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体をさらに備える。別の特定の実施形態において、本発明のキットは、目的のポリペプチドへの抗体の結合を検出するための手段を備える (例えば、この抗体は、検出可能な基質 (例えば、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物もしくは発光化合物) に結合体化され得るか、または一次抗体を認識する二次抗体が、検出可能な基質と結合体化され得る)。

【0210】

本発明の別の特定の実施形態において、キットは、増殖性および/または癌性のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対して特異的な抗体を含む血清のスクリーニングに使用するための診断キットである。このようなキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を備え得る。このようなキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチドを備え得る。このエピトープは、少なくとも1つの抗ポリペプチド抗体と特異的に免疫反応する。さらに、このようなキットは、ポリペプチドに対する上記の抗体の結合を検出するための手段を備える (例えば、抗体は、蛍光化合物 (例えば、フローサイトメトリーにより検出され得るフルオレセインまたはローダミン) と結合体化され得る)。特定の

実施形態において、キットは、組換え的に産生されたポリペプチドまたは化学的に合成されたポリペプチドを備え得る。キットのポリペプチドはまた、固体支持体に付着され得る。

【0211】

より特定の実施形態において、上記のキットの検出手段は、上記のポリペプチドが付着する固体支持体を備える。このようなキットはまた、非付着レポーター標識化抗ヒト抗体を備え得る。この実施形態において、ポリペプチドへの抗体の結合は、上記のレポーター標識化抗体の結合によって検出され得る。

【0212】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清のスクリーニングにおいて使用するための、診断キットを含む。この診断キットは、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドと特異的に免疫反応する実質的に単離された抗体、およびこの抗体へのこのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの結合を検出するための手段を備える。1つの実施形態において、抗体は、固体支持体に付着される。特定の実施形態において、抗体は、モノクロナール抗体であり得る。キットのこの検出手段は、二次標識化モノクロナール抗体を含み得る。あるいは、またはさらに、この検出手段は、標識化競合ポリペプチドを含み得る。

【0213】

1つの診断構成において、試験血清を、本発明の方法により得られる表面結合ポリペプチドを有する固相試薬と反応させる。ポリペプチド特異的抗体とこの試薬との結合、および洗浄することによる結合していない血清成分の除去の後、この試薬をレポーター標識化抗ヒト抗体と反応させて、固体支持体上に、結合した抗ポリペプチド抗体の量に比例して、この試薬にレポーターを結合させる。この試薬を再び洗浄して、結合していない標識化抗体を除去し、そしてこの試薬と会合するレポーターの量を決定する。代表的に、レポーターは、酵素であり、この酵素は、適切な蛍光性基質、発光性基質または比色用基質 (Sigma, St. Louis, MO) の存在下で固相をインキュベートすることにより検出される。

【0214】

上記アッセイにおいて、固体表面試薬は、固体支持体物質（例えば、ポリマービーズ、ディップスティック、96ウェルプレートまたは濾過材料）へタンパク質物質を付着することについての公知の技術によって調製される。これらの付着法は、一般に、支持体へのタンパク質の非特異的吸着またはタンパク質の共有結合性の付着（代表的に、固体支持体上の化学的反応基に対して遊離のアミン基（例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、もしくはアルデヒド基）による）を包含する。あるいは、ストレプトアビジンコートプレートが、ビオチン化抗原と組み合わせて使用され得る。

【0215】

従って、本発明は、この診断方法を実施するためのアッセイ系またはキットを提供する。このキットは、一般に、表面に結合した組換え抗原を有する支持体、および表面に結合した抗抗原抗体を検出するためのレポーター標識化抗ヒト抗体を含む。

【0216】

（融合タンパク質）

任意のスタニオカルシンポリペプチドは、融合タンパク質を産生するために使用され得る。例えば、スタニオカルシンポリペプチドは、第2のタンパク質と融合される場合、抗原性タグとして使用され得る。スタニオカルシンポリペプチドに対して惹起される抗体は、スタニオカルシンに結合することによって、第2のタンパク質を間接的に検出するために使用され得る。さらに、分泌されるタンパク質は、細胞位置を輸送シグナルに基づいて標的化するので、スタニオカルシンポリペプチドは、他のタンパク質に一旦融合されると標的化分子として使用され得る。

【0217】

スタニオカルシンポリペプチドと融合され得るドメインの例は、異種シグナル配列のみならず、他の異種機能性領域をも含む。融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。

【0218】

特に好ましい実施形態において、本発明のスタニオカルシンタンパク質は、スタニオカルシンポリペプチドが、m - nとして上記される融合タンパク質を含む。好ましい実施形態において、適用は、本明細書中に記載される特定のN末端およびC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列に少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である核酸分子に向けられる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によって包含される。

【0219】

さらに、融合タンパク質はまた、スタニオカルシンポリペプチドの特徴を改良するために操作され得る。例えば、さらなるアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域が、宿主細胞からの精製または続く取り扱いおよび貯蔵の間の安定性および持続性を改良するためにスタニオカルシンポリペプチドのN末端へ付加され得る。また、ペプチド部分は精製を容易にするためにスタニオカルシンポリペプチドへ付加され得る。このような領域は、スタニオカルシンポリペプチドの最終調製の前に除去され得る。ポリペプチドの取り扱いを容易にするためのペプチド部分の付加は、当該分野でよく知られる慣用の技術である。

【0220】

さらに、スタニオカルシンポリペプチド（フラグメント、そして特にエピトープを含む）は、免疫グロブリン（IgG）の定常ドメインの一部と組み合わせられ、キメラポリペプチドを生じ得る。これらの融合タンパク質は精製を容易にし、そしてインビボにおける増大した半減期を示す。1つの報告された例は、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメイン、および哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載している（EP A 394,827; Traunckerら、Nature、331: 84-86（1988））。ジスルフィド連結二量体構造（IgGに起因する）を有する融合タンパク質もまた、モノマー分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子に結合しそして中和するのにさらに効率的であり得る（Fountoulakisら、J. Biochem. 270: 3958-64（1995））。

【0221】

同様に、EP-A-O 464 533 (カナダ国対応特許第2045869号)は、別のヒトタンパク質またはその部分とともに免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を含む融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る (EP-A 0232 262)。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Fc部分を欠失させることが望ましい。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Fc部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、hIL-5のようなヒトタンパク質は、hIL-5のアンタゴニストを同定するための高処理能力スクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されてきた (Bennettら、J. Molecular Recognition、8:52-58 (1995); Johansonら、J. Biol. Chem. 270:9459-71 (1995)を参照のこと)。

【0222】

さらに、本明細書中で議論されるように、本発明のポリペプチドおよび/または抗体 (これらのフラグメントまたは改変体を含む) は、アルブミン (限定しないが、組換えヒト血清アルブミンまたはそのフラグメントまたは改変体 (例えば、1999年3月2日に発行された米国特許第5,876,969号、EP特許第0 413 622号、および1998年6月16日に発行された米国特許第5,766,883号を参照のこと (これらは、本明細書中においてその全体で参考として援用される))) と融合され得る。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体 (これらのフラグメントまたは改変体を含む) は、ヒト血清アルブミンの成熟形態 (すなわち、EP特許第0 322 094号 (これは、本明細書中においてその全体で参考として援用される) の図1および2に示されるヒト血清アルブミンのアミノ酸1~585) と融合される。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体 (これらのフラグメントまたは改変体を含む) は、米国特許第5,766,883号 (これは、本明細書中においてその全体で参考として援用される) に記載される

、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1 - z (ここで、zは、369~419の整数である)を含むか、あるいは、これらからなるポリペプチドフラグメントと融合される。本発明のポリペプチドおよび/または抗体(これらのフラグメントおよび改変体を含む)は、異種タンパク質(例えば、免疫グロブリンFcポリペプチドまたはヒト血清アルブミンポリペプチド)のN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、本発明によって包含される。

【0223】

さらに、スタニオカルシンポリペプチドはマーカー配列(例えば、スタニオカルシンの精製を容易にするペプチド)に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけヘキサ-ヒスチジンペプチド(例えば、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)において提供されるタグ)であり、これらの多くのマーカーアミノ酸配列が市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグである「HA」タグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する(Wilsonら、Cell 37:767(1984))。

【0224】

従って、任意のこれら上記の融合物は、スタニオカルシンポリヌクレオチドまたはスタニオカルシンポリペプチドを使用して操作され得る。

【0225】

(ベクター、宿主細胞、およびタンパク質産生)

本発明はまた、スタニオカルシンポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞、および組換え技術によるポリペプチドの産生に関連する。例えば、ベクターは、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターであり得る。レトロウイルスベクターは、複製コンピテント、または複製欠損であり得る。後者の場合、一般的にウイルス増殖は、補完性(c o

plementing) 宿主細胞にのみ生じる。

【0226】

スタニオカルシンポリヌクレオチドは、宿主における増殖のために選択マーカーを含むベクターに連結され得る。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈澱物のような沈澱物、または荷電脂質との複合体において導入される。ベクターがウイルスである場合、ウイルスベクターは、適切なパッケージング細胞株を使用してインビトロでパッケージングされ、次いで宿主細胞に形質導入され得る。

【0227】

スタニオカルシンポリヌクレオチド挿入物は、適切なプロモーター（いくつか挙げれば、例えば、ファージ PL プロモーター、E. coli lac プロモーター、trp プロモーター、phoA プロモーターおよびtac プロモーター、SV40 初期プロモーターおよびSV40 後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーター）に作動可能に連結されるべきである。他の適切なプロモーターは当業者に公知である。発現構築物はさらに、転写開始、転写終結のための部位、および転写領域において、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。構築物によって発現される転写物のコード部分は、好ましくは、始めに翻訳開始コドン、および翻訳されるためのポリペプチドの末端に適切に位置される終結コドン（UAA、UGAまたはUAG）を含む。

【0228】

示されるように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも1つの選択マーカーを含む。このようなマーカーは、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、G418、またはネオマイシン耐性遺伝子、ならびにE. coli および他の細菌において培養するためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適切な宿主の代表的な例は、細菌細胞（例えば、E. coli、Streptomyces および Salmonella typhimurium 細胞）；酵母細胞のような真菌細胞；Drosophila S2 および Spodoptera Sf9 細胞のような昆虫細胞；CHO 細胞、COS 細胞、293 細胞、および Bowes メラノーマ細胞のような動物細胞；なら

びに植物細胞を含むが、これらに限定されない。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は、当該分野で公知である。

【0229】

細菌における使用のために好ましいベクターの中には、pQE70、pQE60およびpQE-9(QIAGEN, Inc. から入手可能); pBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene Cloning Systems, Inc. から入手可能); およびptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia Biotech, Inc. から入手可能)を含む。好ましい真核生物ベクターの中には、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG(Stratageneから入手可能); ならびにpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL(Pharmaciaから入手可能)がある。他の適切なベクターは当業者に容易に明らかである。

【0230】

選択マーカーとしてグルタミンシンターゼ(GS)またはDHFRを使用するベクターは、薬物メチオニンスルホキシミンまたはメトトレキサートそれぞれの存在下で増幅され得る。ベクターに基づくグルタミンシンターゼの利点は、グルタミンシンターゼ陰性である細胞株(例えば、マウス骨髄腫細胞株、NS0)についての利用可能性である。グルタミンシンターゼ発現系はまた、内因性遺伝子の機能化を妨げるためにさらなるインヒビターを提供することによって、グルタミンシンターゼ発現細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞)において機能し得る。グルタミンシンターゼ発現系およびその成分は、PCT公報、WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; およびWO91/06657(これらは、本明細書中において、本明細書によってその全体で参考として援用される)に詳細に記載される。さらに、グルタミンシンターゼ発現ベクターは、Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH)から得られ得る。マウス骨髄腫細胞におけるGS発現系を使用するモノクローナル抗体の発現および産生は

、Bebbingtonら、Bio/technology 10:169(1992)およびBiblia and Robinson Biotechnol. Prog. 11:1(1995)(これらは、本明細書中で参考として援用される)に記載される。

【0231】

本発明はまた、本明細書中に議論されるベクター構築物を含む宿主細胞に関し、そしてさらに、当該分野で公知の技術を使用して、1以上の異種制御領域(例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー)に作動可能に連結されている、本発明のヌクレオチド配列を含む宿主細胞を包含する。宿主細胞は、哺乳動物細胞(例えば、ヒト由来の細胞)のような高等真核生物細胞、または酵母細胞のような下等真核生物細胞であり得るか、あるいは宿主細胞は、細菌細胞のような原核生物細胞であり得る。挿入された遺伝子配列の発現を調節するか、または所望される特定の様式で遺伝子産物を改変および処理する宿主株が、選択され得る。特定のプロモーターからの発現は、特定のインデューサーの存在下で増強され得；従って、遺伝子操作されたポリペプチドの発現が、制御され得る。さらに、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳および翻訳後のプロセッシングおよび改変(例えば、リン酸化、切断)の特徴および特異的機構を有する。適切な細胞株は、発現される外来タンパク質の所望の改変およびプロセッシングを保障するように選択され得る。

【0232】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または他の方法によってもたらされ得る。このような方法は、Davisら、Basic Methods In Molecular Biology(1986)のような多くの標準的研究室マニュアルに記載される。スタニオカルシンポリペプチドが、実際に、組換えベクターを欠く宿主細胞によって発現され得ることが特に意図される。

【0233】

スタニオカルシンポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって組換え細胞培養物から回収され得、そして精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）が精製のために使用される。

【0234】

スタニオカルシンポリペプチド、および好ましくは分泌形態はまた、以下から回収され得る：直接単離されるかまたは培養されるかにかかわらず、体液、組織および細胞を含む天然の供給源から精製された産物；化学的合成手順の産物；ならびに、例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む、原核生物宿主または真核生物宿主から組換え技術によって産生された産物。組換え産生手順に使用される宿主に依存して、スタニオカルシンポリペプチドは、グリコシル化されてもまたはグリコシル化されていなくてもよい。さらに、スタニオカルシンポリペプチドもまた、宿主媒介プロセスの結果として、いくつかの場合において、最初の改変されたメチオニン残基を含み得る。従って、一般に、翻訳開始コドンによってコードされるN末端メチオニンが、すべての真核生物細胞における翻訳後の任意のタンパク質から高い効率で除去されることは当該分野において周知である。ほとんどのタンパク質においてN末端メチオニンもまた、ほとんどの原核生物において効果的に除去されるが、いくつかのタンパク質について、この原核生物除去プロセスは、N末端メチオニンが共有結合するアミノ酸の性質に依存しており、非効率的である。

【0235】

本明細書において議論されるベクター構築物を含む宿主細胞を含むことに加えて、本発明はまた、脊椎動物起源（特に、哺乳動物起源）の一次（primary）宿主細胞、二次（secondary）宿主細胞、および不死化宿主細胞を含む。これらの宿主細胞は、内因性の遺伝物質（例えば、スタニオカルシンコード配列）を欠失または置換するように操作されており、そして/または本発明の

スタニオカルシンポリヌクレオチドと作動可能に連結された遺伝物質（例えば、異種ポリヌクレオチド配列）を含むように操作され、そして内因性のスタニオカルシンポリヌクレオチドを活性化、変更、および/または増幅する。例えば、当該分野で公知の技術は、相同組換えを介して、異種制御領域（例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー）および内因性スタニオカルシンポリヌクレオチド配列を作動可能に連結するために使用され得る（例えば、米国特許第5,641,670号；国際公開第WO 96/29411；国際公開第WO 94/12650；Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:8932-8935(1989)；およびZijlstraら、Nature、342:35-438(1989)を参照のこと。これらの開示の各々は、それら全体において参考として援用される）。

【0236】

さらに、本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の技術を用いて化学合成され得る（例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y. およびHunkapillerら、Nature, 310:105-111を参照のこと）。例えば、スタニオカルシンポリペプチドのフラグメントに対応するペプチドは、ペプチド合成機の使用により合成され得る。さらに、所望の場合、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸アナログが、置換または付加としてこのスタニオカルシンポリペプチド配列に導入され得る。非古典的アミノ酸としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：通常のアミノ酸のD異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 t -ブチルグリシン、 t -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸（例えば、 β -メチルアミノ酸）、 γ -メチルアミノ酸、 δ -メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸アナログ。さらにアミノ酸

はD（右旋性）またはL（左旋性）であり得る。

【0237】

本発明は、翻訳の間または翻訳後に、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子または他の細胞性リガンドへの結合などによって示差的に改変されるスタニオカルシンポリペプチドを含む。任意の多数の化学的改変は、以下を含むがこれらに限定されない公知の技術によって実施され得る：臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、 NaBH_4 による特異的化学的切断；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成；など。

【0238】

本発明によって含まれるさらなる翻訳後修飾としては、例えば、以下などが挙げられる：N結合型もしくはO結合型の炭水化物鎖（N末端またはC末端のプロセシング）、アミノ酸バックボーンへの化学部分の結合、N結合型もしくはO結合型の炭水化物鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加もしくは欠失。このポリペプチドはまた、検出可能な標識（例えば、酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識）を用いて改変して、このタンパク質の検出および単離が可能にされ得る。

【0239】

適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；ならびに、適切な放射性物質の例としては、ヨウ素（ ^{121}I 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{111}In 、 112

In、 ^{113m}In 、 ^{115m}In)、テクネチウム(^{99}Tc 、 ^{99m}Tc)、タリウム(^{201}Tl)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム(^{103}Pd)、モリブデン(^{99}Mo)、キセノン(^{133}Xe)、フッ素(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru)が挙げられる。

【0240】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントまたは改変体は、ポリペプチドに対して、放射性金属(限定しないが、 ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{166}Ho 、および ^{153}Sm を含む)と会合する大環状キレート剤に取り付けられる。好ましい実施形態において、大環状キレート剤と会合する放射性金属イオンは、 ^{111}In である。別の好ましい実施形態において、大環状キレート剤と会合する放射性金属イオンは、 ^{90}Y である。特定の実施形態において、大環状キレート剤は、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)である。他の特定の実施形態において、DOTAは、リンカー分子を介して本発明の抗体またはそのフラグメントに取り付けられる。DOTAを結合するのに有用なリンカー分子の例は、当該分野において周知である。例えば、DeNardoら、Clin Cancer Res. 4(10):2483-90(1998); Petersonら、Bioconjug. Chem. 10(4):553-7(1999); および Zimmermanら、Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50(1999)(これらは、本明細書によって、その全体において本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

【0241】

本発明によってまた、さらなる利点(例えば、このポリペプチドの溶解度、安定性および循環時間の増加、または免疫原性の減少)を提供し得る、スタニオカルシンの化学修飾誘導体が提供される(米国特許第4,179,337号を参照のこと)。誘導体化のための化学部分は、水溶性ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなど)から選択さ

れ得る。このポリペプチドは、この分子内のランダムな位置で、またはこの分子内の所定の位置で改変され得、そして1、2、3以上の結合した化学部分を含み得る。

【0242】

このポリマーは、任意の分子量のポリマーであり得、そして分枝状でまたは非分枝状であり得る。ポリエチレングリコールに関しては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の容易さのために、約1 kDaと約100 kDaとの間（用語「約（およそ）」は、ポリエチレングリコールの調製物において、いくつかの分子は示した分子量よりも重く、いくつかは示した分子量よりも軽いことを示す）である。所望の治療プロフィール（例えば、所望される持続放出の持続時間、存在する場合には生物学的活性に対する効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または抗原性がないこと、および治療タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の効果）に依存して、他のサイズが用いられ得る。例えば、ポリエチレングリコールは、約200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000、または100,000 kDaの平均分子量を有し得る。

【0243】

上記のように、ポリエチレングリコールは、分枝構造を有していてもよい。分枝ポリエチレングリコールは、例えば、以下に記載される：米国特許第5,643,575号；Morpurgoら、Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996)；Vorobjevら、Nucleo

sides Nucleotides 18:2745-2750 (1999)
;およびCalicetiら、Bioconj. Chem. 10:638-646 (1999) (これらの各々の開示は、本明細書中において参考として援用される)。

【0244】

ポリエチレングリコール分子(または他の化学的部分)は、このタンパク質の機能的ドメインまたは抗原性ドメインに対する効果を考慮してこのタンパク質に結合されるべきである。当業者に利用可能な多数の結合方法が存在する(例えば、本明細書中に参考として援用される、EP 0 401 384に開示される方法(G-CSFにPEGを結合する)、Malikら、Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992) (塩化トレシル(tresyl chloride)を用いたGM-CSFのペグ化を報告する)もまた参照のこと)。例えば、ポリエチレングリコールは、反応性基(例えば、遊離のアミノ基またはカルボキシル基)を介してアミノ酸残基により共有結合され得る。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合し得る基である。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としては、リジン残基およびN末端アミノ酸残基が挙げられ得る;遊離のカルボキシル基を有するアミノ酸残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC末端アミノ酸残基が挙げられ得る。スルフヒドリル残基もまた、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として用いられ得る。治療目的のために好ましいのは、アミノ基での結合、例えば、N末端またはリジン基での結合である。

【0245】

上記で示唆されるように、ポリエチレングリコールは、多くのアミノ酸残基のいずれかへの結合を介してタンパク質に結合され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、リジン残基、ヒスチジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、またはシステイン残基への共有結合を介してタンパク質に連結され得る。1つ以上の反応化学系を用いて、タンパク質の特定のアミノ酸残基(例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸またはシステイン)またはタンパク質の1つより多くの型のアミノ酸残基(例えば、リジン、ヒスチジン、ア

スパラギン酸、グルタミン酸、システインおよびそれらの組み合わせ)にポリエチレングリコールを結合し得る。

【0246】

N末端で化学修飾されたタンパク質を具体的に所望し得る。ポリエチレングリコールを本発明の組成物の例示として用いて、種々のポリエチレングリコール分子から(分子量、分枝などによって)、反応混合物中でのタンパク質(ポリペプチド)分子に対するポリエチレングリコール分子の比、行われるべきペグ化(pegylation)反応の型、および選択されたN末端ペグ化タンパク質の獲得方法を選択し得る。N末端ペグ化調製物の獲得方法(すなわち、必要な場合、この部分を他のモノペグ化部分から分離すること)は、ペグ化タンパク質分子の集団からの、N末端ペグ化物質の精製により行われ得る。N末端修飾で化学修飾された選択的タンパク質は、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な異なる型の第1級アミノ基(リジン対N末端)の示差的反応性を利用する還元的アルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下では、カルボニル基含有ポリマーを用いた、N末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

【0247】

上記で示されたように、本発明のタンパク質のペグ化は、かなり多数の手段によって達成され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、直接的または介在リンカーによってのいずれかで、タンパク質に結合され得る。タンパク質にポリエチレングリコールを結合させるためのリンカーレス(linkerless)系は、Delgadoら、Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304(1992); Francisら、Intern. J. of Hematol. 68:1-18(1998); 米国特許第4,002,531号; 米国特許第5,349,052号; WO95/06058; およびWO98/32466(これらの各々の開示は、本明細書中で参考として援用される)に記載される。

【0248】

介在するリンカーを伴わずに、タンパク質のアミノ酸残基に直接的にポリエチ

レングリコールを結合させる1つの系は、トレシル化(tresylated) MPEG(これは、塩化トレシル(tresylchloride)($\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$)を使用して、モノメトキシ(monmethoxy)ポリエチレングリコール(MPEG)を改変することによって生成される)を使用する。トレシル化MPEGとのタンパク質の反応に際して、ポリエチレングリコールは、タンパク質のアミン基に直接結合される。従って、本発明は、本発明のタンパク質と2,2,2-トリフルオロエタン(trifluoroethane)スルホニル基を有するポリエチレングリコール分子とを反応させることによって生成されるタンパク質-ポリエチレングリコール結合体を含む。

【0249】

ポリエチレングリコールはまた、多くの異なる介在リンカーを使用して、タンパク質に結合され得る。例えば、米国特許第5,612,460号(この開示全体が、本明細書中で参考として援用される)は、タンパク質にポリエチレングリコールを結合させるためのウレタンリンカーを開示する。ポリエチレングリコールが、リンカーによってタンパク質に結合されるタンパク質-ポリエチレングリコール結合体はまた、MPEG-スクシンイミジルスクシネート(succinimidylsuccinate)、1,1'-カルボニルジイミダゾールで活性化されたMPEG、MPEG-2,4,5-トリクロロフェニルカルボネート(trichloropenylcarbonate)、MPEG-p-ニトロフェノールカルボネート、および種々のMPEG-スクシネート誘導体のような化合物とのタンパク質の反応によって生成され得る。さらなる多くのポリエチレングリコール誘導体、およびタンパク質にポリエチレングリコールを結合させるための反応化学が、国際公開番号WO98/32466(この開示全体が、本明細書中で参考として援用される)に記載される。本明細書中に示される反応化学を使用して生成されるペグ化タンパク質産物は、本発明の範囲内に含まれる。

【0250】

本発明の各タンパク質に結合されたポリエチレングリコール部分の数(すなわち、置換の程度)もまた、変動し得る。例えば、本発明のペグ化タンパク質は、平均して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、17、2

0個またはそれより多いポリエチレングリコール分子を連結し得る。同様に、平均の置換の程度は、タンパク質1分子あたり1~3、2~4、3~5、4~6、5~7、6~8、7~9、8~10、9~11、10~12、11~13、12~14、13~15、14~16、15~17、16~18、17~19、または18~20個のポリエチレングリコール部分のような範囲内である。置換の程度を決定する方法は、例えば、Delgadoら、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 9:249-304(1992)において考察される。

【0251】

本発明のスタニオカルシンポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含むが、これらに限定されない周知の方法によって化学合成および組換え細胞培養物から回収され、そして精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)が精製のために用いられる。ポリペプチドが単離および/または精製の間に変性する場合、タンパク質をリホールディングするための周知の技術が、活性な高次構造を生成するために利用され得る。

【0252】

本発明のスタニオカルシンポリペプチドは、モノマーまたはマルチマー(すなわち、ダイマー、トリマー、テトラマーおよびより高度のマルチマー)であり得る。従って、本発明は、モノマーおよびマルチマーの本発明のスタニオカルシンポリペプチド、それらの調製ならびにそれらを含む組成物(好ましくは薬学的組成物)に関する。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、モノマー、ダイマー、トリマーまたはテトラマーである。さらなる実施形態では、本発明のマルチマーは、少なくともダイマー、少なくともトリマー、または少なくともテトラマーである。

【0253】

本発明によって含まれるマルチマーは、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。本明細書中で用いられる場合、用語ホモマーは、(本明細書中に記載されるように、スタニオカルシンフラグメント、改変体、スプライス改変体および融合タンパク質を含む)本発明のスタニオカルシンポリペプチドのみを含むマルチマーをいう。これらのホモマーは、同一または異なるアミノ酸配列を有するスタニオカルシンポリペプチドを含み得る。特定の実施形態では、本発明のホモマーは、同一のアミノ酸配列を有するスタニオカルシンポリペプチドのみを含むマルチマーである。別の特定の実施形態では、本発明のホモマーは、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むマルチマーである。特定の実施形態では、本発明のマルチマーは、ホモダイマー(例えば、同一および/または異なるアミノ酸配列を有するスタニオカルシンポリペプチドを含む)あるいはホモトリマー(例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有するスタニオカルシンポリペプチドを含む)である。さらなる実施形態では、本発明のホモマー性マルチマーは、少なくともホモダイマー、少なくともホモトリマーまたは少なくともホモテトラマーである。

【0254】

本明細書中で用いられる場合、用語ヘテロマーとは、本発明のスタニオカルシンポリペプチドに加えて1以上の異種ポリペプチド(すなわち、異なるタンパク質のポリペプチド)を含むマルチマーをいう。特定の実施形態では、本発明のマルチマーは、ヘテロダイマー、ヘテロトリマーまたはヘテロテトラマーである。さらなる実施形態では、本発明のヘテロマー性マルチマーは、少なくともヘテロダイマー、少なくともヘテロトリマーまたは少なくともヘテロテトラマーである。

【0255】

本発明のマルチマーは、疎水性、親水性、イオン性および/もしくは共有結合的な結合の結果であり得、そして/または例えば、リポソーム形成によって間接連結され得る。従って、1つの実施形態では、本発明のマルチマー(例えば、ホモダイマーまたはホモトリマーなど)は、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態では、本発明のヘテロマルチマー(

例えば、ヘテロトリマーまたはヘテロテトラマーなど)は、本発明のポリペプチドが、溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体(本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む)と接触した場合に形成される。他の実施形態では、本発明のマルチマーは、本発明のポリペプチドとの、および/または本発明のポリペプチド間での共有結合によって形成される。このような共有結合は、ポリペプチド配列(例えば、配列番号2に記載されるか、またはプラスミドスタニオカルシンによってコードされるポリペプチドに含まれる配列)に含まれる1以上のアミノ酸残基を含み得る。1例では、この共有結合は、ネイティブ(すなわち、天然に存在する)ポリペプチドにおいて相互作用するポリペプチド配列内に存在するシステイン残基間での架橋である。別の例では、この共有結合は、化学的操作または組換え操作の結果である。あるいは、このような共有結合は、融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列において含まれる1以上のアミノ酸残基を含み得る。1例では、共有結合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列間にある(例えば、米国特許第5,478,925号を参照のこと)。特定の例では、この共有結合は、(本明細書中に記載されるような)本発明のスタニオカルシン-Fc融合タンパク質に含まれる異種配列間にある。別の特定の例では、本発明の融合タンパク質の共有結合は、共有結合したマルチマーを形成し得る別のタンパク質(例えば、オステオプロテゲリン(osteoprotegerin)など)由来の異種ポリペプチド配列間にある(例えば、国際公開番号WO 98/49305号(この内容はその全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。

【0256】

本発明のマルチマーは、当該分野で公知の化学技術を使用して生成され得る。例えば、本発明のマルチマーに含まれることが所望されるポリペプチドは、当該分野で公知のリンカー分子およびリンカー分子長最適化技術を使用して、化学的に架橋され得る(例えば、米国特許第5,478,925号(これは本明細書中でその全体が参考として援用される)を参照のこと)。さらに、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の技術を使用して生成されて、マルチマー中に含まれることが所望されるポリペプチドの配列内に位置するシステイン残基間に、1つ以

上の分子間架橋を形成し得る（例えば、米国特許第5,478,925号（これは、本明細書中にその全体が参考として援用される）を参照のこと）。さらに、本発明のタンパク質は、このポリペプチドのC末端またはN末端へのシステインまたはビオチンの付加により慣用的に改変され得、当該分野で公知の技術が、1つ以上のこれらの改変されたポリペプチドを含むマルチマーを生成するために適用され得る（例えば、米国特許第5,478,925号（これはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。さらに、当該分野で公知技術は、本発明のマルチマーに含まれることを所望されるポリペプチド成分を含むリポソームを生成するために適用され得る（例えば、米国特許第5,478,925号（これはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【0257】

あるいは、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の遺伝子操作技術を用いて生成され得る。1つの実施形態では、本発明のマルチマーに含まれるポリペプチドは、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野で公知の融合タンパク質技術を用いて組換え生成される（例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと）。特定の実施形態では、本発明のホモダイマーをコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、リンカーポリペプチドをコードする配列に連結し、次いでさらに元々のC末端からN末端の方向とは逆方向でポリペプチドの翻訳産物をコードする合成ポリヌクレオチド（リーダー配列を欠く）に連結することによって生成される（例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと）。別の実施形態では、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野で公知の組換え技術を適用して、膜貫通ドメイン（または疎水性もしくはシグナルペプチド）を含み、そして膜再構成技術によってリポソームに取り込まれ得る、本発明の組換えポリペプチドを生成する（例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと）。

（スタニオカルシンポリヌクレオチドの使用）

本明細書中で同定されるスタニオカルシンポリヌクレオチドは、試薬として多

くの方法において使用され得る。以下の説明は、例示とみなされるべきであり、そして公知技術を利用する。スタニオカルシンポリヌクレオチドのさらなる使用は、国際公開番号WO95/24411（これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）に開示される。

【0258】

新しい染色体マーカーを同定する必要性が、現在存在する。なぜなら、実際の配列データ（反復多型性）に基づく染色体マーキング試薬は現在、ほとんど利用可能ではないからである。開示されたcDNAをコードする遺伝子は、8番染色体に存在すると考えられる。従って、本発明に関連するポリヌクレオチドは、8番染色体についての結合分析におけるマーカーとして有用である。

【0259】

簡潔には、配列は、配列番号1において示される配列由来のPCRプライマー（好ましくは、15～25bp）を調製することにより、染色体にマッピングされ得る。プライマーは、コンピュータ分析を使用して選択され得、その結果プライマーは、ゲノムDNAにおける1より多くの推定エクソンにまたがらない。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために使用される。配列番号1に対応するヒトスタニオカルシン遺伝子を含むそれらのハイブリッドのみが、増幅したフラグメントを産生する。

【0260】

同様に、体細胞ハイブリッドは、特定の染色体に対するポリヌクレオチドのPCRマッピングの迅速な方法を提供する。3つ以上のプラスミドが、一日あたり、1つのサーマルサイクラーを用いて、割りあてられ得る。さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドの下位局在化（sublocalization）は、特定の染色体のフラグメントのパネルを用いて、達成され得る。用いられ得る他の遺伝子マッピングストラテジーは、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フローソート（labeled flow-sorted）染色体でのプレスクリーニング、および染色体特異的cDNAライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択を含む。

【0261】

スタニオカルシンポリヌクレオチドの正確な染色体位置はまた、中期染色体スプレッド (spread) の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) を使用して、達成され得る。この技術は、500塩基または600塩基ほどの短いポリヌクレオチドを使用する；しかし、2,000~4,000bpのポリヌクレオチドが、好ましい。この技術の概説については、Vermaら、「Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques」Pergamon Press, New York (1988) を参照のこと。

【0262】

染色体マッピングについて、スタニオカルシンポリヌクレオチドは、個々に(1つの染色体またはその染色体における1つの部位をマークするため)使用され得るか、またはパネル(複数の部位および/または複数の染色体をマークするため)において使用され得る。好ましいポリヌクレオチドは、cDNAの非コード領域に対応する。なぜなら、このコード配列は、遺伝子ファミリーにおいて、より保存されている可能性があり、従って、染色体マッピングの間に交差ハイブリダイゼーションの機会が増加するからである。

【0263】

一旦、ポリヌクレオチドが正確な染色体位置にマッピングされると、ポリヌクレオチドの物理的な位置は、連鎖分析において使用され得る。連鎖分析は、染色体位置と特定の疾患の提示との間の同時遺伝 (coinheritance) を確立する(疾患マッピングデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通じてオンラインで利用可能である)に見出される)。1メガベースのマッピング分解能および20kbあたり1遺伝子と仮定すると、疾患と関連づけられた染色体領域に正確に位置決めされたcDNAは、50~500の潜在的な原因遺伝子のうちの1つであり得る。

【0264】

従って、一旦同時遺伝が確立されると、スタニオカルシンポリヌクレオチド、および罹患個体と非罹患個体との間の対応する遺伝子における差異が試験され得る。第1に、染色体における目に見える構造変化（例えば、欠失または転座）が染色体スプレッドにおいてまたはPCRにより試験される。構造的変化が存在しない場合は、点変異の存在を確認する。いくらかまたは全ての罹患個体で観察されたが、正常個体では観察されない変異は、この変異がこの疾患を引き起こし得ることを示す。しかし、スタニオカルシンポリペプチドおよびいくらかの正常個体由来の対応する遺伝子の完全な配列決定は、多型に由来する変異を区別するために必要である。新たな多型が同定されると、この多型ポリペプチドは、さらなる連鎖分析のために使用され得る。

【0265】

さらに、罹患していない個体と比較した場合に、罹患した個体における増加または減少した遺伝子の発現は、スタニオカルシンポリヌクレオドを用いて評価され得る。いずれかのこれらの改変（発現の改変、染色体の再構成、または変異）が、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。

【0266】

前述に加えて、スタニオカルシンポリヌクレオチドは、三重らせん体形成またはアンチセンスDNAもしくはRNAを通して遺伝子発現を制御するために使用され得る。両方の方法は、DNAまたはRNAへのポリヌクレオドの結合に依存する。これらの技術について、好ましいポリヌクレオドは、通常、20～40塩基長であり、そして転写に關与する遺伝子の領域（三重らせん - Leeら、*Nucl. Acids Res.* 6:3073 (1979); Cooneyら、*Science* 241:456 (1988); および Dervanら、*Science* 251:1360 (1991) を参照のこと）またはmRNA自体（アンチセンス - Okano、*J. Neurochem.* 56:560 (1991); *Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)）のいずれかに対して相補的である。三重らせん体形成は、DNAからのRNA転写の遮断を最適に生じるが

、一方アンチセンスRNAのハイブリダイゼーションは、ポリペプチドへのmRNA分子の翻訳をブロックする。両方の技術は、モデル系において効果的であり、そして本明細書中に開示された情報を使用して、疾患を処置するための試みにおいて、アンチセンスのポリヌクレオチドまたは三重らせん体のポリヌクレオチドを設計し得る。

【0267】

スタニオカルシンポリヌクレオチドはまた、遺伝子治療に有用である。遺伝子治療の目的の1つは、遺伝的欠損を補正するための試みにおいて、欠損遺伝子を有する生物に正常な遺伝子を挿入することである。スタニオカルシンは、非常に正確な様式において、そのような遺伝的欠損を標的化する手段を提供する。別の目的は、宿主のゲノムには存在しなかった新しい遺伝子を挿入し、それにより宿主細胞において新しい形質を産生することである。

【0268】

スタニオカルシンポリヌクレオチドはまた、微量の生物学的サンプルから個体を同定するのに有用である。米国陸軍は、例えば、その個体の識別のために、制限断片長多型(RFLP)の使用を考えている。この技術において、個体のゲノムDNAは、1つ以上の制限酵素で消化され、そしてサザンブロットで探索されて個体を識別するための独特のバンドを生じる。この方法は、紛失、入れ替え、または盗難され得、決定的な識別を困難にする「認識票」の現在の制限に煩わされることがない。スタニオカルシンポリヌクレオチドは、RFLPのさらなるDNAマーカーとして使用され得る。

【0269】

スタニオカルシンポリヌクレオチドはまた、個体のゲノムの選択された部分の塩基ごとの実際のDNA配列を決定することにより、RFLPの代わりとして使用され得る。これらの配列を使用して、そのような選択されたDNAを、増幅および単離するためのPCRプライマーを調製し得る。次いで、これは配列決定され得る。この技術を使用して、個体を識別し得る。なぜなら、各個体は独特なDNA配列のセットを有するからである。一旦、独特なIDデータベースが、個体に対して確立されると、その個体(生存または死亡している)の決定的な識別が

、非常に小さな組織サンプルからなされ得る。

【0270】

法医学的生物学はまた、本明細書中に開示されるようにDNAに基づく識別技術を使用することから利益を得る。非常に小さな生物学的サンプル（例えば、組織（例えば、髪または皮膚）あるいは体液（例えば、血液、唾液、精液など））から得られたDNA配列を、PCRを使用して増幅し得る。1つの先行技術において、多型遺伝子座（例えば、DQaクラスII HLA遺伝子）から増幅された遺伝子配列を法医学的生物学において使用して、個体を識別する（Erllich, H., PCR Technology, Freeman and Co. (1992)）。一旦、これらの特定の多型遺伝子座が増幅されれば、それらを1つ以上の制限酵素で消化して、DQaクラスII HLA遺伝子に対応するDNAでプローブされた、サザンブロットにおいて識別するバンドのセットを生じる。同様に、スタニオカルシンポリヌクレオチドを、法医学的目的のための多型性マーカーとして使用し得る。

【0271】

特定の組織の供給源を同定し得る試薬についての必要性がまた存在する。例えば、起源のわからない組織とともに提示される場合、法医学において、そのような必要性が生じる。適切な試薬は、例えば、スタニオカルシン配列から調製される特定の組織に対して特異的なDNAプローブまたはプライマーを含み得る。そのような試薬のパネルは、種および/または器官の型により組織を同定し得る。同様の様式において、これらの試薬を使用して、汚染について組織培養物をスクリーニングし得る。

【0272】

スタニオカルシンは、胸腺および骨髄の間質細胞において発現することが見出されているので、スタニオカルシンポリヌクレオチドは、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の差示的同定のためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。同様に、スタニオカルシンポリペプチドに対するポリペプチドおよび抗体は、組織または細胞型の差示的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。さらに、上記組織または細胞の多くの障害（特に、骨格およ

び神経系)に関して、「標準の」スタニオカルシン遺伝子発現レベル(すなわち、スタニオカルシン系障害を有さない個体由来の健常組織中のスタニオカルシン発現レベル)に対して有意により高いかまたはより低いレベルのスタニオカルシン遺伝子発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織(例えば、神経組織、骨格組織、癌性組織および創傷組織)または体液(例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液または髄液)において検出され得る。

【0273】

従って、本発明は、以下の工程を包含する障害の診断方法を提供する：(a) 個体の細胞または体液中のスタニオカルシン遺伝子発現レベルをアッセイする工程；(b) 標準的なスタニオカルシン遺伝子発現レベルと、このスタニオカルシン遺伝子発現レベルを比較し、それにより、標準の発現レベルと比較して、アッセイされたスタニオカルシン遺伝子発現レベルの増加または減少が、スタニオカルシン系における障害を示す、工程。

【0274】

少なくとも、スタニオカルシンポリヌクレオチドは、サザンのゲル上の分子量マーカーとして、特定の細胞型における特異的mRNAの存在についての診断プローブとして、新規のポリヌクレオチドを発見するプロセスにおける「減算する(subtract-out)」既知の配列に対するプローブとして、「遺伝子チップ」または他の支持体に付着するためのオリゴマーを選択および作製するために、DNA免疫技術を用いて抗DNA抗体を惹起するために、および免疫応答を惹起する抗原として使用され得る。

【0275】

(スタニオカルシンポリペプチドの使用)

スタニオカルシンポリペプチドは、多くの方法において使用され得る。以下の記述は、例示としてみなされるべきであり、そして公知技術を利用する。スタニオカルシンポリペプチドのさらなる使用は、国際出願番号WO95/24411(これは、本明細書中でその全体が参考として援用される)に開示される。

【0276】

平均の個体におけるレベルと比較した生物学的サンプルにおけるスタニオカル

シタンパク質の変化したレベルは、神経性傷害および/または神経性傷害の傾向を示すようである。従って、本発明のスタニオカルシンポリペプチドおよび本発明のスタニオカルシンポリペプチドに対して生成された抗体は、神経性傷害、神経性疾患または障害を検出、予防、診断またはモニターするか、あるいはそれらの処置をモニターするための免疫アッセイのようなアッセイにおいて使用され得る。

【0277】

本明細書中で論じられるように、本発明のスタニオカルシンポリペプチドは、神経細胞の処置または保護を含むが、これらに限定されない使用を有している。特定の実施形態において、本発明のスタニオカルシンポリペプチドは、低酸素症または虚血によって誘発される神経性損傷を処置および/または防止するために使用される（実施例1を参照）。

【0278】

従って、1つの実施形態において、スタニオカルシンポリペプチドが使用されて、抗体に基づく技術を使用して、生物学的サンプルにおけるタンパク質レベルをアッセイし得る抗体が作製される。例えば、組織におけるタンパク質の発現は、古典的な免疫組織学的方法を用いて研究され得る。（Jalkanenら、*J. Cell. Biol.* 101: 976-985 (1985); Jalkanenら、*J. Cell. Biol.* 105: 3087-96 (1987)）。タンパク質の遺伝子発現を検出するのに有用な、他の抗体に基づく方法には、イムノアッセイ（例えば、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA））が含まれる。適切な抗体アッセイの標識は、当該分野で公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）、および放射性同位体（例えば、ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{112}In ）、およびテクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）ならびにビオチンが挙げられる。

【0279】

生物学的サンプル中の分泌タンパク質のレベルをアッセイすることに加えて、

タンパク質はまた、画像化によりインビボで検出され得る。タンパク質のインビボ画像化のための抗体の標識またはマーカ―は、X線撮影法、NMR、またはESRにより検出可能なものを含む。X線撮影法のために適切な標識は、放射性同位体（例えば、バリウムまたはセシウム）を含み、これは検出可能な放射線を放射するが、被験体に対して明らかに有害ではない。NMRおよびESRのための適切なマーカ―は、検出可能な特徴的なスピンを有するマーカ―（例えば、重水素）を含み、これは、関連するハイブリドーマのための栄養分を標識することにより抗体中に取り込まれ得る。

【0280】

放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴により検出可能な材料のような適切な検出可能な画像化部分で標識された、タンパク質特異的抗体または抗体フラグメントは、哺乳動物に（例えば、非経口的、皮下、または腹腔内に）導入される。被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の約5～20ミリキュリーの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、S. W. Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments」(Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer、第13章、S. W. BurchielおよびB. A. Rhodes編、Masson Publishing Inc. (1982))に記載される。

【0281】

従って、本発明は、神経性傷害および/あるいは神経性疾患または障害の検出、予防、診断およびモニタリングする方法を提供するか、もしくはそれらの処置をモニタリングする方法を提供する。具体的には、このようなアッセイは以下を包含する方法によって行われる：(a) 個体の細胞または体液におけるスタニオ

カルシンポリペプチドの発現をアッセイする工程；(b) 遺伝子の発現レベルを標準の遺伝子発現レベルと比較し、それによって標準の発現レベルと比較してアッセイされたスタニオカルシンポリペプチドの遺伝子発現レベルにおける増加または減少が、神経性傷害および/あるいは神経性疾患または障害、および/または神経性傷害および/あるいは神経性疾患または障害の素因を示す工程。別の実施形態において、このアッセイは以下を包含する方法によって行われる：(a) 免疫特異的結合が起こり得る条件下で、個体由来の生物学的サンプルを抗スタニオカルシン抗体と接触させる工程；および(b) この抗体による免疫特異的結合の量を検出または測定する工程。特定の実施形態において、スタニオカルシンに対する抗体が使用され、生物学的サンプルにおいて、スタニオカルシンの減少したレベルの存在についてアッセイし得る。内因性スタニオカルシンの減少したレベルは、神経細胞の傷害および/あるいは神経性疾患または障害、および/または神経性傷害および/あるいは神経性疾患または障害の素因を示し得る。特定の実施形態において、スタニオカルシンに対する抗体が使用され、生物学的サンプルにおいて、スタニオカルシンの増加したレベルの存在についてアッセイし得る。内因性スタニオカルシンの増加したレベルは、神経細胞の傷害および/あるいは神経性疾患または障害、および/または神経性傷害および/あるいは神経性疾患または障害の素因を示し得る。

【0282】

さらに、スタニオカルシンポリペプチドを用いて疾患を処置し得る。例えば、患者は、スタニオカルシンポリペプチドの非存在またはレベルの減少を元に戻すこと、異なるポリペプチドの非存在またはレベルの減少を補充すること、ポリペプチドの活性を阻害すること、ポリペプチドの活性を活性化すること、遊離リガンドについて膜結合レセプターと競合させることによって膜結合レセプターの活性を減少させること、または所望の応答をもたらすことの試みにおいて、スタニオカルシンポリペプチドが投与され得る。

【0283】

同様に、スタニオカルシンポリペプチドに対する抗体もまた用いられ、疾患を処置し得る。例えば、スタニオカルシンポリペプチドに対する抗体の投与は、ポ

リペプチドを結合して、そしてポリペプチドの過剰産生を低減し得る。同様に、抗体の投与は、例えば、膜に結合したポリペプチド（レセプター）へ結合することにより、ポリペプチドを活性化し得る。

【0284】

少なくとも、スタニオカルシンポリペプチドは、当業者に周知の方法を用いる SDS - PAGE ゲルまたは分子ふるいゲル濾過カラムの分子量マーカーとして使用され得る。宿主細胞の形質転換を評価する方法として、スタニオカルシンポリペプチドがまた用いられて、抗体を惹起し得、次いで、この抗体が宿主細胞の形質転換を評価する方法として使用されて、組換え細胞からのタンパク質発現を測定する。さらに、スタニオカルシンポリペプチドが使用されて、以下の生物学的活性を試験し得る。

【0285】

（遺伝子治療方法）

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するための遺伝子治療方法に関する。この遺伝子治療法は、本発明のスタニオカルシンポリペプチドの発現を達成するために、核酸（DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA）配列を動物へ導入することに関する。この方法は、プロモーター、および標的組織によるこのポリペプチドの発現のために必要な任意の他の遺伝的エレメントに作動可能に連結された、スタニオカルシンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを必要とする。このような遺伝子治療および送達の技術は、当該分野で公知であり、例えば、本明細書中に参考として援用されるWO90/11092を参照のこと。

【0286】

従って、例えば、患者由来の細胞は、エキソビボでスタニオカルシンポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチド（DNAまたはRNA）を用いて操作され得、この操作された細胞は次いで、このポリペプチドで処置されるべき患者に提供される。このような方法は、当該分野で周知である。例えば、Belldegrunら, J. Natl. Cancer Inst., 85:207-16 (1993); Ferrantiniら, Canc

er Research, 53:1107-12(1993); Ferrantiniら, J. Immunology 153:4604-15(1994); Kaidoら, Int. J. Cancer 60:221-29(1995); Oguraら, Cancer Research 50:5102-06(1990); Santodonatoら, Human Gene Therapy 7:1-10(1996); Santodonatoら, Gene Therapy 4:1246-1255(1997); および Zhangら, Cancer Gene Therapy 3:31-38(1996)を参照のこと。これらの文献は、本明細書中に参考として援用される。1つの実施形態では、操作される細胞は、動脈細胞である。この動脈細胞は、動脈、動脈周囲の組織への直接注射によって、またはカテーテル注射によって患者に再度導入され得る。

【0287】

以下でより詳細に考察するように、スタニオカルシンポリヌクレオチド構築物は、注射可能な物質を動物の細胞へ送達する任意の方法（例えば、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓など）の間隙空間への注射）によって送達され得る。スタニオカルシンポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリアにて送達され得る。

【0288】

1つの実施形態では、スタニオカルシンポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドとして送達される。用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、細胞への侵入を補助、促進または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈殿剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、スタニオカルシンポリヌクレオチドはまた、リポソーム処方物中で送達され得、そしてリポフェクチン処方物などは、当業者に周知の方法によって調製され得る。このような方法は、例えば、本明細書中に参考として援用される、米国特許第5,593,972号、同第5,589,466号および同第5,580,859号に記載される。

【0289】

遺伝子治療方法において使用されるスタニオカルシンポリヌクレオチドベクタ

一構築物は好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列を含まない、構築物である。適切なベクターとしては、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG; Pharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL;ならびにInvitrogenから入手可能なpEF1/V5、pcDNA3.1、およびpRc/CMV2が挙げられる。他の適切なベクターは、当業者に容易に明白である。

【0290】

当業者に公知の任意の強力なプロモーターは、スタニオカルシンドNAの発現を駆動するために用いられ得る。適切なプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター）；または異種プロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター）；RSウイルス（RSV）プロモーター；誘導性プロモーター（例えば、MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーター）；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ApoAⅠプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター）；レトロウイルスLTR；b-アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。このプロモーターはまた、スタニオカルシンについてネイティブなプロモーターであり得る。

【0291】

他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの期間の間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【0292】

スタニオカルシンポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する）の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、器官組織の細網線

維間の、細胞間の液体ムコ多糖類基質、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞 (c o n n e c t i v e t i s s u e e n s h e a t h i n g m u s c l e c e l l) 内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下で議論される理由のために好ましい。本発明のポリヌクレオチド構築物は、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達され得る。本発明のポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞 (例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞) において達成され得る。インビボでの筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現する能力において、特に適格である。

【0293】

裸の核酸配列注射のために、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05 mg / kg 体重から約50 mg / kg 体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約0.005 mg / kg から約20 mg / kg であり、そしてより好ましくは約0.05 mg / kg から約5 mg / kg である。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注射の組織部位に応じて変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。

【0294】

好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注射経路による。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に、肺または気管支の組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のスタニオカルシンDNA構築物が、血管形成術の間にこの手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

【0295】

裸のポリヌクレオチドは、送達部位での直接の針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、およびいわゆる「遺伝子銃」を含むがこれらに限定されない

、当該分野で公知の任意の方法によって送達される。これらの送達方法は、当該分野で公知である。

【0296】

この構築物はまた、ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクション、沈殿剤などのような送達ビヒクルを用いて送達され得る。このような送達方法は、当該分野で公知である。

【0297】

特定の実施形態において、スタニオカルシンポリヌクレオチド構築物は、リポソーム調製物中で複合体化している。本発明にて使用するためのリポソーム調製物は、カチオン性（正に荷電した）、アニオン性（負に荷電した）および中性の調製物を包含する。しかしながら、カチオン性リポソームとポリアニオン性核酸との間で強固な荷電複合体を形成し得るので、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、機能的形態において、プラスミドDNA（本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84：7413～7416（1987））；mRNA（本明細書中で参考として援用される、Maloneら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86：6077～6081（1989））；および精製された転写因子（本明細書中で参考として援用される、Debsら、J. Biol. Chem.、265：10189～10192（1990））の細胞内送達を媒介することが示されている。

【0298】

カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、N[1-2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)リポソームは特に有用であり、そして登録商標LipofectinのもとにGIBCO BRL, Grand Island, N.Y.（本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84：7413～7416（1987））をもまた参照のこと、）より入手可能である。他の市販のリポソームとしては、トランスフェクテース(transfectace)(DDAB/DOPE)およびDOTAP/DOPE

(Boehringer)が挙げられる。

【0299】

当該分野で周知の技術を使用して、他のカチオン性リポソームを、容易に入手可能な物質より調製し得る。DOTAP(1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リポソームの合成の記述に関して、例えばPCT公開第WO 90/11092号(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。DOTMALリポソームの調製は文献にて説明されている(例えば、本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413~7417を参照のこと)。類似した方法を使用して、他のカチオン性脂質物質よりリポソームを調製し得る。

【0300】

同様に、アニオン性リポソームおよび中性リポソームは、例えば、Avanti Polar Lipids(Birmingham, Ala.)から容易に入手可能であり、または容易に入手可能な物質を使用して簡単に調製され得る。そのような物質としてはとりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が挙げられる。これらの物質はまた、DOTMA出発物質およびDOTAP出発物質と適切な割合において混合され得る。これらの物質を使用してリポソームを生成する方法は、当該分野で周知である。

【0301】

例えば、商業的に、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を種々の組み合わせにおいて使用し、コレステロールを添加してもしなくても、従来のリポソームを生成し得る。従って、例えば、超音波処理バイアル中への窒素ガス流下で、DOPGおよびDOPCの各50mgを乾燥することにより、DOPG/DOPC小胞を調製し得る。この

サンプルを一晩真空ポンプ下に置き、そして次の日、脱イオン水で水和する。次いで、浴が、15°Cで循環している間、最大設定にて、逆位カップ（浴タイプ）プローブを装備したHeat Systems モデル350超音波処理器を使用して、このサンプルを栓をしたバイアル中にて2時間超音波処理する。あるいは、負に荷電した小胞を、超音波処理なしで調製して多重膜小胞を生成し得るか、または核孔膜（nucleopore membrane）を通して押し出すことにより別々の大きさの単膜小胞を生成し得る。他の方法は、当業者に公知でありそして利用可能である。

【0302】

このリポソームとしては、多重膜リポソーム（MLV）、小さな単膜リポソーム（SUV）または大きな単膜リポソーム（LUV）が挙げられ得、SUVが好ましい。当該分野で周知の方法を使用して、種々のリポソーム-核酸複合体が調製される。例えば、本明細書中で参考として援用される、Straubingerら、Methods of Immunology、101:512~527（1983）を参照のこと。例えば、核酸を含有するMLVは、ガラスチューブの壁面にリン脂質の薄膜を堆積させ、そしてその後、カプセル化されるべき物質の溶液で水和することによって調製され得る。SUVはMLVの長期超音波処理により調製され、単膜リポソームの均質集団を生成する。封入されるべき物質を、予め形成されたMLVの懸濁液に添加し、次いで、超音波処理する。カチオン性脂質を含むリポソームを使用する場合、乾燥した脂質膜を、滅菌水または10mM Tris/NaClのような等張性緩衝溶液のような適切な溶液中に再懸濁し、超音波処理し、次いで、予め形成されたりポソームをDNAと直接混合する。正に荷電したりポソームのカチオン性DNAへの結合に起因して、リポソームおよびDNAは非常に安定な複合体を形成する。SUVは、小核酸フラグメントを用いての用途を見出す。LUVは、当該分野で周知の多くの方法により調製される。一般に使用される方法としては、Ca²⁺-EDTAキレート化（Papaahadjopoulosら、Biochim. Biophys. Acta、394:483（1975）；Wilsonら、Cell、17:77（1979））；エーテル注入（Deamer, D.およびBangham, A., Bioc

him. Biophys. Acta、443:629(1976); Ostror
ら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、76:836
(1977); Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. US
A、76:3348(1979); 界面活性剤透析(Enoch, HおよびS
trittmatter, P.、Proc. Natl. Acad. Sci. US
A、76:145(1979)); および逆相エバポレーション(REV)(F
raleyら、J. Biol. Chem.、255:10431(1980);
Szoka, F. およびPapahadjopoulos, D.、Proc. N
atl. Acad. Sci. USA、75:145(1978); Schaefer
-Ridderら、Science、215:166(1982))が挙げ
られ、これらの文献は本明細書中で参考として援用される。

【0303】

一般に、DNAのリポソームに対する割合は約10:1から約1:10までである。好ましくは、その割合(ratio)は約5:1から約1:5までである。より好ましくは、その割合は約3:1から約1:3までである。さらにより好ましくは、その割合は約1:1である。

【0304】

米国特許第5,676,954号(本明細書中で参考として援用される)はカチオン性リポソームキャリアと複合体化された遺伝物質のマウスへの注入について報告する。米国特許第4,897,355号、同第4,946,787号、同第5,049,386号、同第5,459,127号、同第5,589,466号、同第5,693,622号、同第5,580,859号、同第5,703,055号および国際公開第WO94/9469号(これらは本明細書中で参考として援用される)は、DNAを細胞および哺乳動物にトランスフェクトする際に使用するためのカチオン性脂質を提供する。米国特許第5,589,466号、同第5,693,622号、同第5,580,859号、同第5,703,055号および国際公開第WO94/9469号(これらは本明細書中で参考として援用される)は、DNA-カチオン性脂質複合体を哺乳動物に送達する方法を提供する。

【0305】

特定の実施形態において、スタニオカルシンをコードする配列を含むRNAを含むレトロウイルス粒子を使用して、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。レトロウイルスプラスミドベクターを誘導し得るレトロウイルスとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0306】

このレトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞株の例としては、その全体が本明細書中で参考として援用される、Miller、Human Gene Therapy、1:5~14(1990)にて記載されるようなPE501、PA317、R-2、R-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、RCRE、RCRIP、GP+E-86、GP+envAm12およびDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。このベクターは、当該分野で公知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リポソームの使用、およびCaPO₄沈殿が挙げられるが、それらに限定されない。1つの代替法において、このレトロウイルスプラスミドベクターをリポソームにカプセル化するか、または脂質に結合して、次いで宿主に投与し得る。

【0307】

このプロデューサー細胞株は、スタニオカルシンをコードするポリヌクレオチドを含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インビトロまたはインビボのどちらかにおいて、真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、スタニオカルシンを発現する。

【0308】

特定の他の実施形態において、アデノウイルスベクター中に含まれるスタニオ

カルシンポリヌクレオチドを用いて、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。アデノウイルスは、それがスタニオカルシンポリペプチドをコードし、そして発現し、それと同時に通常の溶解性ウイルス生活環にて複製するその能力に関して不活性化されるように操作され得る。アデノウイルス発現は、そのウイルスDNAの宿主細胞染色体への組み込み無しに達成され、それによって、挿入性変異誘発についての心配が軽減される。さらに、アデノウイルスは、何年もの間、腸の生ワクチンとして優れた安全側面を伴って使用されている (Schwartz et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 109:233-238 (1974))。最終的に、アデノウイルス媒介性遺伝子移入が、コトラットの肺への α 1-アンチトリプシンおよびCFTRの移入を含む多くの例において実証されている (Rosenfeld et al., *Science*, 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155 (1992))。さらに、ヒト癌における原因物質としてアデノウイルスを確立しようとする広範な研究は、一様に否定的であった (Green et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:6606 (1979))。

【0309】

本発明において有用である適切なアデノウイルスベクターが、例えば、KozarskyおよびWilson, *Curr. Opin. Genet. Devel.*, 3:499-503 (1993); Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155 (1992); Engelhardt et al., *Human Genet. Ther.*, 4:759-769 (1993); Yang et al., *Nature Genet.*, 7:362-369 (1994); Wilson et al., *Nature*, 365:691-692 (1993); および米国特許第5,652,224号に記載されており、これらは本明細書中で参考として援用される。例えば、アデノウイルスベクターAd2が有用であり、そしてヒト293細胞にて増殖され得る。これらの細胞は、アデノウイルスのE1領域を含み、そして構成的にE1aおよびE1bを発現し、このことは、このベクターから欠失している遺伝子の産物を提供することによって欠損アデノウイルスを補完する。Ad2に加えて、他の多様なアデノウイルス (例えば、Ad3、Ad5、およびAd7) もま

た、本発明において有用である。

【0310】

好ましくは、本発明において使用されるアデノウイルスは、複製欠損性である。複製欠損アデノウイルスは、感染性粒子を形成するために、ヘルパーウイルスおよび/またはパッケージング細胞株の助けを必要とする。得られたウイルスは、細胞に感染する能力があり、そしてプロモーターに作動可能に連結された目的のポリヌクレオチドを発現し得るが、ほとんどの細胞にて複製し得ない。複製欠損アデノウイルスは、次の遺伝子：E1a、E1b、E3、E4、E2aまたはL1からL5までのすべてまたは一部のうちの1つ以上にて欠失され得る。

【0311】

特定の他の実施形態において、アデノ随伴ウイルス(AAV)を使用して、エキソピボまたはインピボでこの細胞を操作する。AAVは、感染性粒子を生成するためにヘルパーウイルスを必要とする、天然に存在する欠損ウイルスである(Muzyczka, Curr. Topics in Microbiol. Immunol., 158:97(1992))。AAVはまた、非分裂細胞の中にそのDNAを組み込み得る数少ないウイルスの中の1つである。300塩基対程度の小さいAAVを含むベクターがパッケージされ得、そして組み込み得るが、外来性DNAのためのスペースは約4.5kbに限られる。そのようなAAVの生成および使用の方法は当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,139,941号、同第5,173,414号、同第5,354,678号、同第5,436,146号、同第5,474,935号、同第5,478,745号および同第5,589,377号を参照のこと。

【0312】

例えば、本発明において使用するために適切なAAVベクターは、DNA複製、キャプシド形成、および宿主細胞組み込みに必要な配列すべてを含む。Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press(1989)において見い出される方法のような、標準的クローニング方法を使用して、スタニオカルシンを含むポリヌクレオチド構築物を、このAAVベクターに挿

入する。次いで、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む、任意の標準的技術を使用して、この組換えAAVベクターを、ヘルパーウイルスに感染しているパッケージング細胞にトランスフェクトする。適切なヘルパーウイルスとしては、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、ワクシニアウイルス、またはヘルペスウイルスが挙げられる。一旦パッケージング細胞がトランスフェクトおよび感染されると、それらはスタニオカルシンポリヌクレオチド構築物を含む感染性AAVウイルス粒子を生成する。次いで、エキソピボまたはインピボのいずれかで、これらのウイルス粒子を使用して真核生物細胞を形質導入する。この形質導入細胞は、そのゲノムに組み込まれたスタニオカルシンポリヌクレオチド構築物を含み、そしてスタニオカルシンを発現する。

【0313】

遺伝子治療の別の方法は、相同組換え（例えば、米国特許第5,641,670号；国際公開第WO96/29411号；国際公開第WO94/12650号；Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:8932~8935(1989)；およびZijlstraら、Nature、342:435~438(1989)を参照のこと）を介して、異種制御領域および内在性ポリヌクレオチド配列（例えば、スタニオカルシンをコードしている配列）を作動可能に連結する工程を含む。この方法は、標的細胞中に存在しているが、通常はその細胞中で発現しないかまたは所望するよりも低いレベルで発現する、遺伝子の活性化を含む。

【0314】

当該分野で既知の標準的技術を使用して、ポリヌクレオチド構築物を作製する。この構築物は、プロモーターを、そのプロモーターに隣接した標的化配列とともに含む。適切なプロモーターが、本明細書中に記載されている。標的化配列は、内在性配列に対して十分に相補的であり、プロモーター-標的化配列と内在性配列との相同組換えを可能にする。標的化配列は、所望されるスタニオカルシン内在性ポリヌクレオチド配列の5'末端の十分近くに存在し、それゆえ、相同組換えに際して、プロモーターは、内在性配列に作動可能に連結される。

【0315】

このプロモーターおよび標的化配列は、PCRを使用して増幅され得る。好ましくは、この増幅されたプロモーターは、5'末端および3'末端に別の制限酵素部位を含む。好ましくは、第1の標的化配列の3'末端は、増幅されたプロモーターの5'末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第2の標的化配列の5'末端は、増幅されたプロモーターの3'末端と同じ制限部位を含む。増幅されたプロモーターおよび標的化配列を消化し、そしてともに連結する。

【0316】

裸のポリヌクレオチドとしてか、もしくは上記により詳細に記載されるようなリポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、ウイルス全体、リポフェクション、沈殿剤などのようなトランスフェクション促進剤と一緒にかのいずれかで、このプロモーター-標的化配列構築物を細胞に送達する。直接針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、粒子加速器などを含む任意の方法により、Pプロモーター-標的化配列を送達し得る。この方法を、下記により詳細に記載する。

【0317】

プロモーター-標的化配列構築物は、細胞により取り込まれる。この構築物と内在性配列との間に相同組換えが起こり、その結果、内在性スタニオカルシン配列は、このプロモーターの制御下に配置される。次いで、このプロモーターは、内在性スタニオカルシン配列の発現を駆動する。

【0318】

好ましくは、スタニオカルシンをコードするポリヌクレオチドは、そのタンパク質の分泌を促進する分泌シグナル配列を含む。代表的に、このシグナル配列は、コード領域の5'末端に向かってかまたは5'末端で発現される、そのポリヌクレオチドのコード領域に位置する。このシグナル配列は、目的のポリヌクレオチドに対して同種または異種であり得、そしてトランスフェクトされる細胞に対して同種または異種であり得る。さらに、当該分野で公知の方法を使用して、このシグナル配列は化学合成され得る。

【0319】

その投与形態によって、治療効果を提供するのに十分な量にて1つ以上の分子が発現される限り、上記のポリヌクレオチド構築物のうちのいずれかの任意の投

与形態が使用され得る。これは、直接針注射、全身注射、カテーテル注入、バイオリスティック (biolistic) 注射器、粒子加速器 (すなわち、「遺伝子銃」)、ゲルフォームスポンジデポ (depot)、他の市販デポ (depot) 物質、浸透圧ポンプ (例えば、Alzaミニポンプ)、経口用または坐剤用の固形 (錠剤または丸剤) 薬学的処方物、および手術中のデカンティングまたは局所適用を含む。例えば、ラット肝臓およびラット脾臓へのリン酸カルシウム沈澱した裸のプラスミドの直接注射、または門脈へのタンパク質被覆プラスミド直接注射は、ラット肝臓における外来遺伝子の遺伝子発現をもたらした (Kanedaら、Science、243:375 (1989))。

【0320】

局所投与の好ましい方法は、直接注射によるものである。好ましくは、送達ビヒクルと複合体を形成した本発明の組換え分子は、動脈領域内部に直接注射により投与されるか、または動脈領域内部に局所投与される。動脈領域内部での組成物の局所投与とは、その組成物を動脈内に数センチメートル、好ましくは数ミリメートルで注射することを言う。

【0321】

局所投与の別の方法は、外科的創傷内またはその周辺に本発明のポリヌクレオチド構築物を接触させることである。例えば、患者は手術を経験し得、そしてこのポリヌクレオチド構築物を創傷内部の組織表面上に被覆され得るか、またはその構築物を創傷内部の組織領域に注射され得る。

【0322】

全身投与に有用な治療組成物は、本発明の標的化された送達ビヒクルと複合体を形成した本発明の組換え分子を含む。全身投与で使用するために適切な送達ビヒクルは、特定部位に対してそのビヒクルを標的化するリガンドを含むリポソームを含む。

【0323】

全身投与の好ましい方法としては、静脈内注射、エアロゾル、経口および経皮 (局所的) 送達が挙げられる。当該分野で標準的な方法を使用して、静脈内注射が実行され得る。当該分野で標準的な方法を使用して、エアロゾル送達もまた実

行され得る（例えば、本明細書中で参考として援用される、Striblingら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、189:11277~11281(1992)を参照のこと）。動物の腸内の消化酵素による分解に耐える能力をもつキャリアに対して本発明のポリヌクレオチド構築物が複合体を形成することにより、経口送達は実行され得る。そのようなキャリアの例としては、当該分野で公知であるもののような、プラスチックカプセルまたは錠剤が挙げられる。皮膚内へ通過可能な親油性試薬（例えば、DMSO）と本発明のポリヌクレオチド構築物を混合することによって、局所的送達は実行され得る。

【0324】

送達される物質の有効量を決定することは、例えば、その物質の化学構造および生物学的活性、動物の年齢および体重、処置を必要とする正確な状態およびその重症度、ならびに投与経路を含む、多数の因子に依存し得る。処置の頻度は、1用量あたりの投与されるポリヌクレオチド構築物の量ならびに被験体の健康および病歴のような多くの因子に依存する。正確な量、投薬回数および投薬のタイミングは、主治医または主治獣医により決定される。

【0325】

本発明の治療的組成物は、任意の動物に、好ましくは哺乳動物および鳥類に投与され得る。好ましい哺乳動物としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマおよびブタが挙げられ、特にヒトが好ましい。

【0326】

（スタニオカルシンの生物学的活性）

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストをアッセイに使用し、1つ以上の生物学的活性について試験し得る。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストが特定のアッセイにおいて活性を示す場合、スタニオカルシンはその生物学的活性に関連した疾患に関与し得るようである。従って、スタニオカルシンを使用し、関連した疾患を処置し得る。

【0327】

(神経活性)

本明細書に開示されるように、本発明のスタニオカルシン (stannio calcin) 組成物は、損傷および傷害から神経細胞を保護する (実施例1を参照のこと)。従って、本発明のスタニオカルシンポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびアゴニストまたはアンタゴニストは、脳および/または神経系の疾患、障害、損傷または傷害の診断および/または処置のために用いられ得る。本発明のスタニオカルシン組成物 (例えば、スタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、および/またはアゴニストもしくはアンタゴニスト) を用いて処置され得る神経系の障害としては、軸索の切断、ニューロンの減少もしくは変性、または脱髄のいずれかを引き起こす、神経系損傷および、疾患または障害が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法に従って、患者 (ヒト患者および非ヒト哺乳動物患者を含む) において処置され得る神経系病変には、以下の中枢神経系 (脊髄、脳を含む) もしくは末梢神経系のいずれかの病変が挙げられるが、これらに限定されない: (1) 虚血病変 (ここで、神経系の一部における酸素不足により、ニューロンの損傷または死が生じ、これには大脳梗塞もしくは虚血、または脊髄梗塞もしくは虚血が挙げられる); (2) 外傷病変 (身体的損傷により生じるかまたは手術に関連する病変、例えば、神経系の一部を切断する病変、または圧縮損傷を含む); (3) 悪性病変 (ここで、神経系の一部は、神経系関連悪性疾患もしくは非神経系組織由来の悪性疾患のいずれかである悪性組織により破壊または損傷される); (4) 感染性病変 (ここで、神経系の一部は、例えば、膿瘍による感染の結果として、破壊または損傷されるか、あるいはヒト免疫不全ウイルス、帯状ヘルペスもしくは単純ヘルペスウイルスによる感染と関連するか、ライム病、結核、梅毒に関連する); (5) 変性病変 (ここで、神経系の一部は、変性プロセスの結果として破壊または損傷され、これには、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンティングトン舞蹈病または筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関連する変性が挙げられるが、これらに限定されない); (6) 栄養性の疾患または障害に関連する病変 (ここで、神経系の一部は、栄養障害または代謝障害によって破壊または損傷され、これには、ビタミンB12欠乏症、葉酸欠乏症、ヴェルニッケ病、タバコ-アルコール弱視、マルキアファ

ーヴァ - ビニャーミ病（脳梁の一次変性）およびアルコール小脳変性が挙げられるが、これらに限定されない）；（7）全身性疾患に関連する神経性病変（糖尿病（糖尿病性ニューロパシー、ベル麻痺）、全身性エリテマトーデス、癌または類肉腫症が挙げられるが、これらに限定されない）；（8）毒性物質（アルコール、鉛または特定の神経毒を含む）により生じる病変；ならびに（9）脱髄性病変（ここで、神経系の一部分は、脱髄性執権によって破壊または損傷され、これには、多発性硬化症、ヒト免疫不全ウイルス関連脊髄障害、横断脊髄障害または種々の病因、進行性多病巣性白質脳障害、および橋中央ミエリン溶解が挙げられるが、これらに限定されない）。

【0328】

1つの実施形態において、本発明のスタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、低酸素症の損傷効果から神経細胞を保護するために用いられる。さらなる好ましい実施形態において、本発明のスタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳低酸素症の損傷効果から神経細胞を保護するために用いられる。この実施形態によると、本発明のスタニオカルシン組成物は、大脳低酸素症に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。この実施形態の1つの非排他的な局面において、本発明のスタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳虚血と関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。この実施形態の別の非排他的な局面において、本発明のスタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳梗塞に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。

【0329】

別の好ましい実施形態において本発明のスタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。特定の実施形態において、本発明のスタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する大脳神経細胞損傷を処置または予防

するために用いられる。

【0330】

別の好ましい実施形態において、本発明のスタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。特定の実施形態において、本発明のスタニオカルシンポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する大脳神経細胞損傷を処置または予防するために用いられる。

【0331】

神経系障害を処置または予防するのに有用な本発明の組成物は、ニューロンの生存または分化の促進における生物学的活性について試験することによって、選択され得る。例えば、制限する目的ではないが、以下の効果のいずれかを誘発する本発明のスタニオカルシン組成物は、本発明によると有用であり得る：(1) 低酸素症または低酸素状態の存在下または非存在下での培地におけるニューロンの増加した生存時間；(2) 培地またはインビボにおけるニューロンの増加した出芽；(3) 培地またはインビボにおけるニューロン関連分子（例えば、運動ニューロンに関して、コリンアセチルトランスフェラーゼまたはアセチルコリンステラーゼ）の増加した産生；あるいは(4) インビボにおけるニューロン機能障害の軽減した症状。このような効果は、当該分野で公知の任意の方法によって測定され得る。好ましくは、非制限的な実施形態において、ニューロンの増加した生存時間は、本明細書中に記載される方法、またはそうでなければ当該分野で公知の方法（例えば、実施例1に記載される方法、Arakawaら（*J. Neurosci.* 10:3507~3515（1990））に記載される方法）を使用して慣用的に測定され得；ニューロンの増加した出芽は、当該分野で公知の方法（例えば、Pestronkら（*Exp. Neurol.* 70:65~82（1980））またはBrownら（*Ann. Rev. Neurosci.* 4:17~42（1981））に記載される方法）によって検出され得；ニューロン関連分子の増加した産生は、当該分野で公知の技術を使用し、測定されるべき分子に依存して、バイオアッセイ、酵素アッセイ、抗体結合、ノザンプロットアッセ

イなどによって、測定され得；そして運動ニューロンの機能障害は、運動ニューロン障害の物理的発現（例えば、弱さ、運動ニューロンの伝導速度、または機能障害）を評価することによって、測定され得る。

【0332】

特定の実施形態において、本発明に従って処置または予防され得る運動ニューロンの障害には、運動ニューロンおよび神経系の他の成分に影響を与え得る障害（例えば、梗塞、感染、毒素への暴露、外傷、外科的損傷、変性疾患、または悪性疾患）、ならびにニューロンに選択的に影響する障害（例えば、筋萎縮性側索硬化症）が挙げられるが、これらに限定されず、そしてこれには、進行性脊髄性筋萎縮症、進行性球延髄麻痺、原発性側索硬化症、小児筋萎縮および若年性筋萎縮、小児期の進行性球麻痺（ファチオ - ロンデ病）、ポリオおよびポリオ後症状、ならびに遺伝性運動感覚性神経障害（シャルコー - マリー - トゥース病）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0333】

さらに、スタニオカルシンは、ニューロン生存；シナプス形成；伝達；神経分化などにおいて役割を果たし得る。従って、本発明のスタニオカルシン組成物（スタニオカルシンポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびアゴニストまたはアンタゴニストを含む）は、学習および/または認識の障害を含むがこれに限定されない、スタニオカルシンのこれらの役割に関連する疾患または障害を、診断、および/または処置または予防するのに用いられ得る。本発明のスタニオカルシン組成物はまた、神経変性性疾患状態および/または行動障害の処置または予防において有用であり得る。このような神経変性性疾患状態および/または行動障害としては以下が挙げられるがこれらに限定されない：アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ツレット症候群、精神分裂病、躁病、痴呆、偏執症、強迫性障害、鬱病、恐慌性障害、学習障害、ALS、精神病、自閉、および行動変化（栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚の障害を含む）。さらに、本発明のスタニオカルシン組成物は、発生中の胚、または伴性障害に関連する発生の障害の処置、予防および/または検出において役割を果たし得る。

【0334】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニスト（例えば、抗スタニオカルシン抗体）は、特定の神経系疾患または障害のマーカ―またはディテクター（detector）として使用され得る。本発明の組成物を用いて処置、予防、診断および/または予後判定され得る神経系疾患および障害としては、例えば以下が挙げられる：脳疾患のような中枢神経系疾患（例えば、無動無言症、脳幹神経節疾患、脳膿瘍、中枢聴覚疾患（例えば、聴覚知覚障害または中枢聴覚障害）、脳性小児麻痺、代謝性または慢性脳疾患、脳水腫、脳新生物、Canavan病、小脳疾患、びまん性脳硬化、脳血管疾患、痴呆、脳炎、脳軟化症（例えば、白化軟化症（leukomalacia））、てんかん、ハレルフォルデン シュパッツ症候群、水頭症（例えば、ダンディ ウォーカー症候群または正常圧水頭症）、視床下部疾患（例えば、視床下部新生物）、大脳マラリア、ナルコレプシー、脱力発作、延髄ポリオ（bulbar poliomyelitis）、大脳偽腫瘍、レット症候群、ライ症候群、視床疾患、大脳トキソプラズマ症、頭蓋内結核腫およびツェルヴェーガー症候群。

【0335】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置され得る脳幹神経節の型としては、以下が挙げられる：例えば、薬物誘導静座不能、アルツハイマー病、舞蹈病、ハンティングトン病、クロイツフェルト ヤーコブ症候群、薬物誘導ジスキネジー、変形性筋失調症、ハレルフォルデン シュパッツ症候群、肝レンズ核変性症、メージュ症候群、神経弛緩薬性悪性症候群、パーキンソン病（例えば、症候性または脳炎後）、進行性核上性麻痺、またはツレット症候群。

【0336】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置され得る代謝性脳疾患の型としては、例えば以下が挙げられる：無 リポ蛋白血症、ガングリオシドーシス（例えば、GM1ガングリオシドーシス、ザントホフ病、またはテイ サックス病）、ハートナップ病、肝性脳障害、肝レンズ核変性、ホモシスチ

ン尿症、核黄疸、縮れ毛症候群、リー病、レッシュ ナイハン症候群、カエデシロップ病、ミトコンドリア脳ミオパシー（例えば、MELAS症候群またはMERRF症候群）、橋中央ミエリン溶解、ニューロンセロイド脂褐素沈着症、ニーマン ピック病、フェニルケトン尿症、ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ欠損、またはヴェルニッケ脳障害。

【0337】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置され得る脳新生物の型としては、例えば、以下が挙げられる：小脳新生物、テント外（*infratentorial*）新生物、脳室新生物、脈絡叢新生物、視床下部新生物、またはテント下新生物。

【0338】

さらなる実施形態において、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置され得る小脳疾患の型としては、例えば、小脳性運動失調、脊髄小脳変性、毛細血管拡張性運動失調、小脳性共同運動障害、フリートライヒ運動失調、マチヤド ジョセフ病、オリブ橋小脳萎縮、または小脳新生物（例えば、テント外新生物）。

【0339】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置され得るびまん性大脳硬化症の型としては、例えば、以下が挙げられる：軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症、または亜急性硬化性汎脳炎。

【0340】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、以下を含むがこれらに限定されない脳血管障害に関連する疾患、損傷、障害または傷害から神経細胞を保護する際に有用であり得る：頸動脈疾患（例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄およびモヤモヤ病）、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、脳無酸素症、大脳動脈硬化症、大脳動

静脈奇形、大脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓症（例えば、頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群）、脳出血（例えば、硬膜上血腫、硬膜下血腫およびクモ膜下出血）、脳亀裂骨折、脳虚血（例えば、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群および椎骨脳底不全（*vertebrobasilar insufficiency*））、血管性痴呆（例えば、多発脳梗塞性痴呆）、白質軟化症、脳室周囲、血管性頭痛（例えば、群発性頭痛）。

【0341】

さらなる実施形態において、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置され得る痴呆症の型としては例えば以下が挙げられる：エイズ痴呆複合症、初老期痴呆（例えば、アルツハイマー病およびクロイツフェルト-ヤコブ病）、老年痴呆（例えば、アルツハイマー病および進行性核上性麻痺）または血管性痴呆。

【0342】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置され得る脳炎の型としては、例えば、以下が挙げられる：軸周囲性脳炎、ウイルス性脳炎（例えば、流行性脳炎、日本脳炎、セントルイス脳炎、マダニ媒介性脳炎および西ナイル熱）、脳脊髄炎、急性播種性脳脊髄炎（例えば、ブドウ膜髄膜炎症候群）、脳炎後パーキンソン病および亜球性硬化性汎脳炎。

【0343】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置され得るてんかんの型としては、例えば、以下が挙げられる：全身てんかん、（例えば、アブサンステんかん（*absence epilepsy*））、ミオクローヌステんかん（例えば、MERRF症候群）、強直・間代てんかん、點頭痙攣）および部分てんかん（例えば、複雑部分てんかん、前頭葉てんかんおよび側頭葉てんかん）、外傷後てんかん、てんかん重積持続状態（例えば、持続性部分てんかん）。

【0344】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置され得る神経系疾患および障害としてはまた、例えば、以下が挙げられる：中枢神経系感染、中枢神経新生物、脱髄疾患、脳脊髄炎、高圧神経症候群、髄膜炎、脊髄疾患、スティッフマン症候群、精神遅滞、神経系異常、神経系新生物、末梢神経新生物、神経学的発現、または神経筋疾患。

【0345】

より詳細には、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置され得る中枢神経系感染の型としては、例えば以下が挙げられる：エイズ痴呆複合症、脳膿瘍、硬膜下膿胸、脳炎（例えば、軸周囲脳炎、ウイルス性脳炎、流行性脳炎、日本脳炎、セントルイス脳炎、マダニ媒介性脳炎および西ナイル熱）、急性播種性脳脊髄炎、髄膜炎（例えば、ブドウ膜炎症候群）、脳炎後パーキンソン病、亜急性硬化性汎脳炎、脳脊髄炎（例えば、ウマの脳脊髄炎またはベネズエラウマ脳脊髄炎）、壊死性出血性脳脊髄炎、ビスナ、大脳マラリア、髄膜炎（例えば、クモ膜炎、無菌性髄膜炎、またはウイルス性髄膜炎（例えば、リンパ球性脈絡髄膜炎）、細菌性髄膜炎（例えば、ヘモフィルス属、リステリア属、髄膜炎菌（例えば、ウォーターハウス フリーデリックセン症候群）、肺炎球菌または髄膜炎性結核）、真菌性髄膜炎（例えば、クリプトコックス属）、硬膜下滲出、髄膜炎（例えば、ブドウ膜炎症候群）、脊髄炎（例えば、横断脊髄炎）、神経梅毒（例えば、脊髄ろう）、ポリオ（例えば、球部（bulbar）ポリオまたはポリオ後症候群）、プリオン疾患（例えば、クロイツフェルト ヤーコブ病、ウシの海綿状脳症、ゲルストマン シュトロイスラー症候群、クールー、またはスクラピー）または大脳トキソプラズマ症。

【0346】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置され得る中枢神経系新生物の型としては、例えば以下が挙げられる：脳新生物（例えば、大脳新生物、テント外新生物、脳室新生物、脈絡叢新生物、視床下部新生物、テント

下新生物、脳脊髄膜新生物、または脊髄新生物（例えば、硬膜外新生物）。

【0347】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る脱髄疾患の型としては、例えば、以下が挙げられる：キャナヴァン病、びまん性脳硬化症（diffuse cerebral sclerosis）、副腎脳白質ジストロフィー、軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、びまん性脳硬化症、異染性白質萎縮症、アレルギー性脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、進行性多病巣性白質脳障害、多発性硬化症、橋中央ミエリン溶解、横断脊髄炎、視神経脊髄炎、スクラピー、または脊柱前弯症。

【0348】

さらなる実施形態では、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る脳脊髄炎の型としては、例えば、以下が挙げられる：アレルギー性脳脊髄炎、ウマの脳脊髄炎、またはベネズエラウマ脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、ビスナ、または慢性疲労症候群。

【0349】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る脊髄疾患の型としては、例えば、以下が挙げられる：先天性筋無緊張症、筋萎縮性側索硬化症、棘筋萎縮、ヴェルドニッヒ - ホフマン病、脊髄炎（例えば、横断性）、ポリオ（例えば、延髄性およびポリオ後症候群（Postpoliomyelitis Syndrome））、脊髄圧迫、脊髄新生物、硬膜外新生物（epidural neoplasms）、脊髄空洞症、または脊髄ろう。

【0350】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る精神遅滞の型としては、例えば、以下が挙げられる：アンゲルマン症候群、ネコ鳴き症候群、ド・ランゲ症候群、ダウン症候群、ガングリオシドーシス（例えば、

GM1 ガングリオシドーシス)、ザントホフ病、テイ - サックス病、ハートナッ
プ病、ホモシスチン尿症、ローレンス - ムーン - ビードル症候群、レッシュ - ナ
イハン症候群、カエデシロップ病、ムコリピドーシス、ニューロン性セロイド脂
褐素沈着症、眼脳腎症候群、フェニルケトン尿症、フェニルケトン尿症 (例え
ば、母体性)、プラダー - ヴィリ症候群 (Prader & Wilh Syndrome)、レット症候群、ルービンスタイン - テービ症候群、結節硬化症
、またはWAGR症候群。

【0351】

さらなる実施形態では、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペ
プチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって
処置され得る神経系異常の型としては、例えば、以下が挙げられる：全前脳症、
神経管欠損 (例えば、無脳症、水無脳症、アモルド - チャイド奇形 (amold
& chiad deformity)、脳ヘルニア、髄膜瘤、髄膜脊髄瘤
、脊髄癒合不全 (例えば、嚢胞性二分脊椎または潜在性二分脊椎)、遺伝性運
動および感覚神経障害 (例えば、シャルコー - マリー病、遺伝性視神経萎縮 (h
ereditary optic atrophy)、レフサム病、遺伝性痙性
対麻痺、またはヴェルドニッヒ - ホフマン病)、遺伝性運動および感覚神経障害
(例えば、先天性痛覚脱失または家族性自律神経障害)。

【0352】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、または
スタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る中
枢神経系新生物の型としては、例えば、以下が挙げられる：脳新生物 (例えば、
小脳新生物、テント下 (infratentorial) 新生物、脳室新生物、
脈絡叢新生物、視床下部新生物、またはテント上新生物) 髄膜新生物、脊髄新生
物 (例えば、硬膜外新生物)、末梢神経新生物 (例えば、脳神経新生物、聴神経
腫、または神経線維腫症2)。

【0353】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、または
スタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る神

経学的症状発現の型としては、例えば、以下が挙げられる：認知不能症（例えば、ゲルストマン症候群）、健忘症（例えば、逆向性）、失行症、神経因性膀胱障害、脱力発作、伝達障害（communicative disorders）（例えば、聴覚障害（例えば、難聴、部分的聴力損失、大音量レクルートメント（loudness recruitment）または耳鳴）、言語障害、失語症（例えば、失書症、名称失語症、プロカ失語症、ヴェルニッケ失語症）、失読症、後天性失読症、言語発達障害、発語障害（speech disorders）（例えば、失語症、失書症、名称失語症、プロカ失語症、ヴェルニッケ失語症、構音障害、構語障害、反響言語（echolia）、無言症、または、どもり）、または声の障害（例えば、失声症、嚔声））、除脳硬直状態、せん妄、線維束性攣縮、幻覚、髄膜症、運動障害（例えば、アンゲルマン症候群、運動失調、アテトーシス、舞踏病、失調症、運動低下症、筋肉緊張低下、ミオクローヌス、チック、斜頸、または振せん）、高張、筋肉硬直、スティッフマン症候群、筋肉痙性、疼痛（例えば、関節痛、背部痛（back pain）、顔面痛（facial pain）、頭痛、緊張性頭痛、神経痛、または難治性疼痛）、完全麻痺、顔面神経麻痺、耳帯状疱疹、胃不全麻痺、片麻痺、眼筋麻痺（例えば、複視、デュエーン症候群、ホルナー症候群、慢性進行性外眼筋麻痺症、またはキーンズ症候群）、完全麻痺（例えば、延髄性、局所性痙性不全対麻痺、対麻痺、ブラウン-セカール症候群、四肢麻痺、呼吸性麻痺（respiratory paralysis）、または声帯麻痺（vocal cord paralysis）、不全麻痺、幻影肢、異常反射、発作（seizures）、痙攣、感覚障害（例えば、無嗅覚症、めまい感、幻覚、知覚過敏、痛覚過敏、知覚減退、錯覚、感覚異常症、不穩下肢症、幻影肢、味覚障害（例えば、無味覚症または味覚不全）、視覚障害（例えば、弱視、失明、色覚異常、複視、半盲、暗点、正常以下の視覚）、睡眠障害（例えば、睡眠過剰、クライネ-レヴィン症候群、ナルコレプシー、不眠症、または夢遊症）、痙縮、開口障害、意識消失（例えば、昏睡、持続性植物状態（persistent vegetative state）、または失神）、または、めまい。

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る神経筋疾患の型としては、例えば、以下が挙げられる：先天性筋無緊張症、筋萎縮性側索硬化症、ランバート-イートン筋無力症症候群、運動ニューロン疾患、筋萎縮（例えば、シャルコー-マリー病、棘筋萎縮、またはヴェルドニッヒ-ホフマン病）、ポリオ後症候群（Postpoliomyelitis Syndrome）、筋ジストロフィー、重症筋無力症、萎縮性ミオトニー、先天性ミオトニー、ネマリンミオパシー、家族性周期性四肢麻痺、多発性パラミオクローヌス、局所性痙性不全対麻痺、またはスティッフマン症候群。

【0355】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る神経系の疾患および障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：末梢神経系の疾患（例えば、先端疼痛症）、アミロイドニューロパシー、自律神経系疾患、脳神経系疾患、顔面神経疾患、眼球運動障害、視神経疾患、三叉神経痛、声帯麻痺、脱髄疾患、糖尿病性ニューロパシー、神経圧挫症候群、神経痛、神経炎、遺伝性運動および感覚神経障害、遺伝性感覚および自律神経障害、または末梢神経新生物。

【0356】

さらなる実施形態では、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る自律神経疾患の型としては、例えば、以下が挙げられる：アーディー症候群、バレー-リュウ症候群、家族性自律神経障害、ホルナー症候群、反射性交感神経性ジストロフィー、またはシャイ-ドレーガー症候群。

【0357】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る脳神経筋疾患の型としては、例えば、以下が挙げられる：内耳神経疾患、聴神経腫（acoustic neuroma）、神経線維腫症2、脳神経新生物、聴

神経腫 (a c o u s t i c n e u r o m a)、または神経線維腫症 2。

【0358】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る顔面神経疾患の型としては、例えば、以下が挙げられる：顔面神経痛、顔面神経麻痺（例えば、耳帯状疱疹 (h e r p e s z o s t e r o l t i c u s) またはメルカーソン - ローゼンタール症候群）、または眼球運動障害（例えば、弱視、眼振、動眼神経麻痺、眼筋麻痺（例えば、デュエーン症候群、ホルナー症候群、慢性進行性外眼筋麻痺症またはキーンズ症候群）、斜視、内斜視、または外斜視。

【0359】

より詳細には、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る視神経疾患の型としては、例えば、以下が挙げられる：視神経萎縮、遺伝性視神経萎縮、視神経円板ドルーゼ、視神経炎、視神経脊髄炎、乳頭水腫。

【0360】

さらなる実施形態では、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る脱髄疾患の型としては、例えば、以下が挙げられる：視神経脊髄炎または脊柱前弯症。

【0361】

より詳細には、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る神経圧挫症候群の型としては、例えば、以下が挙げられる：手根管症候群、足根管症候群、胸郭出口症候群、頸肋症候群、および尺骨神経圧挫症候群。

【0362】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る神経痛の型としては、例えば、以下が挙げられる：カウザルギー、頸腕神経痛、顔

面神経痛、または三叉神経痛。

【0363】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る神経炎の型としては、例えば、以下が挙げられる：実験的アレルギー性神経炎、視神経炎、多発性神経炎、多発神経根神経障害、神経根炎、多発性神経根炎。

【0364】

さらなる実施形態では、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る遺伝性運動および感覚神経障害の型としては、例えば、以下が挙げられる：シャルコー - マリー病、遺伝性視神経萎縮、レフサム病、遺伝性痙性対麻痺、またはヴェルドニッヒ - ホフマン病。

【0365】

より詳細には、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る遺伝性感覚および自律神経障害の型としては、例えば、以下が挙げられる：痛覚脱失症、先天性痛覚脱失症、または家族性自律神経障害。

【0366】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置され得る末梢神経新生物の型としては、例えば、以下が挙げられる：脳神経新生物（例えば、聴神経腫または神経線維腫症2）、P O E M S 症候群、坐骨神経痛、味覚性発汗症またはテタニー。

【0367】

（免疫活性）

スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、免疫細胞の増殖、分化、もしくは動員（走化性）を活性化または阻害することにより、免疫系の不全または疾患の処置において有用であり得る。免疫細胞は、造血と呼ばれるプロセスを介して

発達し、多能性幹細胞から骨髄性細胞（血小板、赤血球、好中球およびマクロファージ）およびリンパ系細胞（Bリンパ球およびTリンパ球）を生成する。これら免疫の不全または疾患の病因は、遺伝的、体細胞的（somatic）（例えば、癌およびいくつかの自己免疫性の疾患）、後天的（例えば、化学療法もしくは毒素による）または感染的であり得る。さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、特定の免疫系の疾患または障害のマーカ―または検出物質（detector）として使用され得る。

【0368】

スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、造血細胞の不全または疾患の処置または検出において有用であり得る。スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、特定の（または多くの）型の造血細胞の減少に関連した疾患を処置する試みにおいて、多能性幹細胞を含む造血細胞の分化および増殖を増加させるために用いられ得る。免疫不全症候群の例としては、血液タンパク質の疾患（例えば、無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症）、毛細血管拡張性運動失調、分類不能型免疫不全、ディ・ジョージ症候群、HIV感染、HTLV-BLV感染、白血球接着不全症候群、リンパ球減少、食細胞殺細菌機能不全、重症複合型免疫不全（SCID）、ヴィスコット-オールドリッチ障害、貧血、血小板減少、またはヘモグロビン尿症が挙げられるが、それらに限定されない。

【0369】

さらに、スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストをまた使用して、止血性活性（出血を止めること）または血栓崩壊活性（血餅形成）を調節し得る。例えば、止血活性または血栓崩壊活性を増大させることにより、スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストを使用し、血液凝固の疾患（例えば、無線維素原血症、因子欠損症）、血液血小板の疾患（例えば、血小板減少症）、あるいは外傷、手術ま

たは他の原因から生じる創傷を処置し得る。あるいは、止血活性または血栓崩壊活性を減少させ得るスタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストを使用し、凝血を阻害または溶解し得る。心臓発作（梗塞）、発作（stroke）または瘢痕の処置において、これらの分子は重要であり得る。

【0370】

自己免疫性の障害の処置または検出において、スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストはまた、有用であり得る。多くの自己免疫性の障害は、免疫細胞によって外来性物質として不適切に自己を認識することから生じる。この不適切な認識は、宿主組織の破壊をもたらす免疫応答を引き起こす。従って、免疫応答、特にT細胞の増殖、分化または走化性を阻害し得るスタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストの投与は、自己免疫性の障害の予防において効果的な治療であり得る。

【0371】

処置または検出され得る自己免疫障害の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アディソン病、溶血性貧血、抗リン脂質症候群（antiphospholipid syndrome）、慢性関節リウマチ、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーブズ病、多発性硬化症、重症筋無力症、神経炎、眼炎、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、多発性内分泌腺症、紫斑、ライター病、スティッフマン症候群、自己免疫性甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肺炎症、ギャン-バレー症候群、インスリン依存性糖尿病、および自己免疫性炎症性眼疾患。

【0372】

同様に、アレルギー性の反応および状態（例えば、喘息（特に、アレルギー性喘息））または他の呼吸性の問題はまた、スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストを使用して処置され得る。さらに、これらの分子は、アナフィラキシー、抗

原性分子に対する過敏症、または血液型不適合を処置するために使用され得る。

【0373】

スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストはまた、器官の拒絶または対宿主性移植片病（GVHD）の処置および/または予防のために使用され得る。器官の拒絶は、免疫応答を介して移植組織の宿主免疫細胞の破壊によって生じる。同様に、免疫応答はまた、GVHDに関与するが、しかしこの場合は、外来移植された免疫細胞は、宿主組織を破壊する。免疫応答（特に、T細胞の増殖、分化、または走化性）を阻害するスタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストの投与は、器官拒絶またはGVHDの予防における有効な治療であり得る。

【0374】

同様に、スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストはまた、炎症を調節するために使用され得る。スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストが、炎症性応答に関与する細胞の増殖および/または分化を阻害し得る。これらの分子は、慢性状態および急性状態の両方の炎症性状態（感染に関連する炎症（例えば、敗血症性ショック、敗血症、または全身性炎症性応答症候群（SIRS））、虚血再灌流障害、内毒素死亡率、関節炎、補体媒介超急性拒絶、腎炎、サイトカインまたはケモカインに誘導される肺傷害、炎症性腸疾患、クローン病、もしくはサイトカイン（例えば、TNFまたはIL-1）の過剰産生によって生じる状態が挙げられる）を処置するために使用され得る。

【0375】

（過剰増殖障害）

スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストを使用し、新生物を含む過剰増殖障害を処置または検出し得る。スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、直接

的または間接的な相互作用を介してこの障害の増殖を阻害し得る。あるいは、スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、過剰増殖障害を阻害し得る他の細胞を増殖し得る。

【0376】

例えば、免疫応答を増大させること、特に過剰増殖障害の抗原性の質を増大させることによって、またはT細胞を増殖、分化、もしくは動員することによって、過剰増殖障害を処置し得る。既存の免疫応答を増強するか、または新たな免疫応答を開始するかのいずれかによって、この免疫応答を増大させ得る。あるいは、免疫応答を減少させることもまた、化学療法剤のような、過剰増殖障害を処置する方法であり得る。

【0377】

スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストによって処置または検出され得る過剰増殖障害の例としては、結腸、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、ならびに泌尿生殖器に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0378】

同様に、他の過剰増殖障害もまた、スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストにより処置または検出され得る。このような過剰増殖性障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：高ガンマグロブリン血症、リンパ球増殖性障害、パラプロテイン血症、紫斑、サルコイドーシス、セザリー症候群、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ゴシェ病、組織球増殖症、および任意の他の過剰増殖性疾患、加えて上記に列挙した器官系に見出される新生物。

【0379】

（心臓血管障害）

スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニスト、コードされたスタニオカルシンを使用して、四肢虚血のような末梢動脈疾患を含む、心臓血管障害を処置し得る。

【0380】

心臓血管障害としては、動動脈瘻 (arterio-arterial fistula)、動静脈瘻、大脳動静脈先天異常、先天性心欠陥 (congenital heart defects)、肺動脈弁閉鎖症、およびシミター症候群のような心臓血管異常が挙げられる。先天性心欠陥としては、大動脈縮窄、三房心、冠状脈管奇形 (coronary vessel anomalies)、交差心、右胸心、開存性動脈管 (patent ductus arteriosus)、エプスタイン奇形、アイゼンメンガー複合体、左心室発育不全症候群、左胸心、ファロー四徴症、大血管転位症、両大血管右室起始症、三尖弁閉鎖症、動脈管遺残、および心中隔欠損症 (heart septal defects) (例えば、大動脈肺動脈中隔欠損症 (aortopulmonary septal defect)、心内膜床欠損症、リュタンバッシュエ症候群、ファロー三徴症、心室心中隔欠損症 (ventricular heart septal defects)) が挙げられる。

【0381】

心臓血管障害としてはまた、不整脈、カルチノイド心臓病、高心拍出量 (high cardiac output)、低心拍出量 (low cardiac output)、心タンポナーデ、心内膜炎 (細菌性を含む)、心臓動脈瘤、心停止、うっ血性心不全、うっ血性心筋症、発作性呼吸困難、心臓水腫、心肥大、うっ血性心筋症、左心室肥大、右心室肥大、梗塞後心破裂 (post-infarction heart rupture)、心室中隔破裂、心臓弁疾患、心筋疾患、心筋虚血、心内膜液浸出、心外膜炎 (梗塞性および結核性を含む)、気心膜症、心膜切開後症候群、右心疾患、リウマチ性心疾患、心室機能不全、充血、心臓血管妊娠合併症 (cardiovascular pregnancy complications)、シミター症候群、心血管梅毒、および心血管結核 (cardiovascular tuberculosis) のような心

臓病が挙げられる。

【0382】

不整脈としては、洞性不整脈、心房性細動、心房粗動、徐脈、期外収縮、アダムズ-ストークス症候群、脚ブロック、洞房ブロック、長QT症候群(long QT syndrome)、副収縮、ローン-ギャング-レヴァイン症候群、マヘーム型早期興奮症候群(Mahaim-type pre-excitation syndrome)、ウルフ-パーキンソン-ホワイト症候群、洞不全症候群、頻拍、および心室性細動が挙げられる。頻拍としては、発作性頻拍、上室性頻拍、心室固有調律促進、房室結節性再入頻拍(atrioventricular nodal reentry tachycardia)、異所心房性頻拍、異所接合部頻拍、洞房結節性再入頻拍(sinoatrial nodal reentry tachycardia)、洞性頻拍、トルサード・ポワント、および心室性頻拍が挙げられる。

【0383】

心臓弁疾患としては、大動脈弁機能不全症、大動脈弁狭窄症、心雑音(heart murmurs)、大動脈弁逸脱症、僧帽弁逸脱症、三尖弁逸脱症、僧帽弁機能不全、僧帽弁狭窄症、肺動脈弁閉鎖症、肺動脈弁機能不全、肺動脈弁狭窄症、三尖閉鎖症、三尖弁機能不全、および三尖弁狭窄症が挙げられる。

【0384】

心筋疾患としては、アルコール性心筋症、うっ血性心筋症、肥大型心筋症、弁下部性大動脈狭搾症、弁下部性肺動脈狭搾症、拘束型心筋症、シャーガス心筋症、心内膜線維弾性症、心内膜心筋線維症、キーンズ症候群、心筋再灌流障害、および心筋炎が挙げられる。

【0385】

心筋性虚血としては、狭心症、冠動脈瘤、冠動脈硬化、冠動脈血栓症、冠動脈血管痙攣、心筋梗塞、および心筋気絶(myocardial stunning)のような冠動脈疾患が挙げられる。

【0386】

心臓血管疾患としてはまた、動脈瘤、血管形成異常、血管腫症、細菌性血管腫

症状、ヒッペル - リンダラ疾患 (Hippel - Lindau Disease)、クリペル - トルノネー - ウェーバー症候群、スタージ - ウェーバー症候群、血管運動神経性水腫、大動脈疾患、高安動脈炎、大動脈炎、ルリーシュ症候群、動脈閉塞疾患、動脈炎、動脈内膜炎 (enarteritis)、結節性多発性動脈炎、脳血管障害、糖尿病性血管障害、糖尿病性網膜症、塞栓症、血栓症、先端紅痛症、痔、肝静脈閉塞障害、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管障害、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管疾患、静脈炎、肺静脈閉塞疾患、レーノー病、CREST症候群、網膜静脈閉塞、シミター症候群、上大静脈症候群、毛細血管拡張症、毛細血管拡張性運動失調 (ataxia telangiectasia)、遺伝性出血性毛細管拡張症、精索静脈瘤、拡張蛇行静脈、静脈瘤性潰瘍、脈管炎、および静脈機能不全のような血管疾患が挙げられる。

【0387】

動脈瘤としては、解離性動脈瘤、偽動脈瘤、感染した動脈瘤、破裂した動脈瘤、大動脈性動脈瘤、大脳性動脈瘤、冠動脈瘤、心動脈瘤、および腸骨性動脈瘤が挙げられる。

【0388】

動脈閉塞疾患としては、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄症、線維筋性形成異常、腸間膜性血管閉塞、モヤモヤ病、腎動脈閉塞、網膜動脈閉塞、および閉塞性血栓性血管炎が挙げられる。

【0389】

脳血管障害としては、頸動脈疾患、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、大脳無酸素症、大脳動脈硬化、大脳動静脈先天異常、大脳動脈疾患、大脳の塞栓症および血栓症、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、大脳出血、硬膜上血腫、硬膜下血腫、クモ膜下出血 (subarachnoid hemorrhage)、大脳梗塞、大脳虚血 (一過性を含む)、鎖骨下動脈盗血症候群、室周白軟化症 (periventricular leukomalacia)、血管性頭痛、群発性頭痛、片頭痛、および椎骨基部 (vertebrobasilar) 機能不全が挙げられる。

【0390】

塞栓症としては、空気塞栓症、羊水塞栓症、コレステロール塞栓症、爪先チアノーゼ症候群、脂肪塞栓症、肺動脈塞栓症、および血栓塞栓症が挙げられる。血栓症としては、冠状動脈血栓症、肝静脈血栓症、網膜静脈閉塞、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、および血栓性静脈炎が挙げられる。

【0391】

虚血としては、大脳虚血、虚血性大腸炎、仕切り症候群 (compartment syndrome)、前仕切り症候群 (anterior compartment syndrome)、心筋虚血、再灌流傷害、および末梢四肢虚血が挙げられる。脈管炎としては、大動脈炎、動脈炎、ベーチェット (Behcet) 症候群、チャージ - ストラウス症候群、粘膜皮膚リンパ節症候群、閉塞性血栓性血管炎、過敏性血管炎、シェーンライン - ヘーノホ紫斑病 (Schoenlein - Henoch purpura)、アレルギー性皮膚血管炎およびヴェーゲナー肉芽腫症が挙げられる。

【0392】

スタニオカルシンのポリヌクレオチドまたはポリペプチド、もしくはスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、危険な四肢虚血および冠状動脈疾患の処置に対して特に有効である。実施例において示されるように、実験的に誘導された虚血性ウサギ後肢へのスタニオカルシンポリヌクレオチドおよびポリペプチドの投与は、血圧比、血流、血管造影的スコア、および毛細管密度を回復し得る。

【0393】

スタニオカルシンのポリペプチドは、当該分野で公知である任意の方法を使用して投与され得、これらの方法としては、送達部位における直接的針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、微粒子銃 (biolistic) 注射、粒子加速器、ゲルフォームスポンジデポ、他の市販デポ物質、浸透圧ポンプ、経口または坐剤の固形薬学的処方物、手術中のデカンティングまたは局所適用、エアロゾル送達も挙げられるが、これらに限定されない。そのような方法は当該分野で公知である。スタニオカルシンのポリペプチドは、下記でより詳細に記載

される、薬学的組成物の一部として投与され得る。スタニオカルシンのポリヌクレオチドを送達する方法は本明細書中でより詳細に記載される。

【0394】

(抗新脈管形成活性)

新脈管形成の内因性の、刺激因子とインヒビターとの間の天然に存在する平衡は、阻害影響が優勢である平衡である。Rastinejadら、Cell 56:345~355(1989)。新生血管形成が正常な生理学的条件下において生じるまれな場合(例えば、創傷治癒、器官再生、胚発生、および雌性生殖プロセス)において、新脈管形成は、厳密に調節され、そして空間的および時間的に定められる。病的な新脈管形成の条件(例えば、固形腫瘍増殖を特徴付ける)の下において、これらの調節の制御はできない。調節されていない新脈管形成は病的になり、そして多くの新生物性疾患および非新生物性疾患の進行を維持する。多くの重篤な疾患は、固形腫瘍の増殖および転移、関節炎、いくつかの型の眼の障害および乾癬を含む、異常な新生血管形成により支配される。例えば、Mosesら、Biotech. 9:630~634(1991); Folkmanら、N. Engl. J. Med., 333:1757~1763(1995); Auerbachら、J. Microvasc. Res. 29:401~411(1985); Folkman、Advances in Cancer Research、KleinおよびWeinhouse編、Academic Press、New York、175~203頁(1985); Patz、Am. J. Ophthalmol. 94:715~743(1982); およびFolkmanら、Science 221:719~725(1983)による概説を参照のこと。多くの病的状態において、新脈管形成のプロセスは、その疾患状態に寄与する。例えば、固形腫瘍の増殖が新脈管形成に依存することを示唆する有意なデータが蓄積されている。FolkmanおよびKlagsbrun、Science 235:442~447(1987)。

【0395】

本発明は、本発明のスタニオカルシンのポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびにスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストの投与

による新生血管形成に関連する疾患または障害の処置を提供する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置し得る悪性状態および転移性状態には、本明細書に記載の悪性疾患、固形腫瘍、および癌、ならびに当該分野で公知の他のもの（このような障害の総説については、Fishmanら、*Medicine*、第2版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0396】

本発明のスタニオカルシンのポリヌクレオチドおよびポリペプチド（スタニオカルシンのアゴニストおよび/またはアンタゴニストを含む）を用いて処置され得る新生血管形成に関連する眼の障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植新生血管形成、ならびに他の眼の炎症性疾患、眼の腫瘍、および脈絡膜または虹彩の新生血管形成に関連する疾患。例えば、Waltmanら、*Am. J. Ophthalmol.* 85:704~710 (1978)およびGartnerら、*Surv. Ophthalmol.* 22:291~312 (1978)による総説を参照のこと。

【0397】

さらに、本発明のスタニオカルシンのポリヌクレオチドおよびポリペプチド（スタニオカルシンのアゴニストおよび/またはアンタゴニストを含む）で処置され得る障害としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、アテローム性プラーク、遅延型創傷治癒、顆粒化、血友病性関節、過形成性癒痕、偽関節骨折、オースラー-ウェーバー（Osler-Weber）症候群、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコーマ、および血管接着。

【0398】

さらに、本発明のスタニオカルシンのポリヌクレオチドおよびポリペプチド（スタニオカルシンのアゴニストおよび/またはアンタゴニストを含む）で処置され得る障害および/または状態としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：固形腫瘍、血液由来の（blood born）腫瘍（例えば、白血病

)、腫瘍転移、カポジ肉腫、良性腫瘍(例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫)、慢性関節リウマチ、乾癬、眼の脈管形成疾患(例えば、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、およびブドウ膜炎)、遅延型創傷治癒、子宮内膜症、脈管形成、顆粒化、過形成性癭痕(ケロイド)、偽関節骨折、強皮症、トラコーマ、血管接着、心筋の新脈管形成、冠状側副枝(*coronary collaterals*)、大脳側副枝、動静脈奇形、虚血性四肢新脈管形成、オースラー-ウェーバー症候群、プラーク新生血管形成、毛細血管拡張症、血友病性関節、血管線維腫、線維筋性形成異常、創傷顆粒化、クローン病、アテローム性動脈硬化症、産児制限薬剤(月経を制御する、胎芽着床のために必要な血管新生を予防することによる)、病原性の結果(例えば、ネコ引っかき病(*Rochelle minalia quintosa*)、潰瘍(*Helicobacter pylori*)、バルトネラ症および細菌性血管腫症状)のような新脈管形成を有する疾患。

【0399】

(細胞レベルでの疾患)

スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにスタニオカルシンのアンタゴニストもしくはアゴニストによって処置または検出され得る細胞生存の増大あるいはアポトーシスの阻害に関連する疾患には、癌(例えば、濾胞性リンパ腫、p53変異を有する癌腫、およびホルモン依存性腫瘍、これらは以下:結腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、腸癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立腺癌、カポジ肉腫および卵巣癌を含むが、これらに限定されない);自己免疫障害(例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病(*Behcet's disease*)、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ)およびウイルス感染(例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス)、炎症、対宿主性移植片病、急性移植片拒絶、ならびに慢性移植片拒絶

、が挙げられる。好ましい実施形態において、本発明のスタニオカルシンのポリヌクレオチド、ポリペプチド、および/またはアンタゴニストは、特に上記に列挙される、癌の増殖、進行、および/または転移 (metastasis) を阻害するために使用される。

【0400】

スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置あるいは検出され得る細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態には、悪性疾患の進行および/または転移ならびに以下のような関連する障害が挙げられるが、これらに限定されない：白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む）を含む）ならびに慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病））、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、ならびに固形腫瘍（肉腫および癌腫（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫 (endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌腫、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫 (menangioma)、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫)を含むが、これらに限定されない)。

【0401】

スタニオカルシンのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにスタニオカルシンのアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置あるいは検出され得るアポトーシスの増大に関連する疾患には、以下が挙げられる：AIDS；神

経変性障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または以前に関連した疾患）；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病（Behcet's disease）、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ）、脊髄形成異常症候群（例えば、再生不良性貧血）、対宿主性移植片病、虚血性傷害（心筋梗塞、発作および再灌流傷害によって生じるようなもの）、肝臓傷害（例えば、肝炎関連肝臓傷害、虚血/再灌流傷害、胆汁うっ滞（cholestasis）（胆管傷害）および肝臓癌）；毒物誘導性肝臓疾患（アルコールによって引き起こされるようなもの）、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【0402】

（創傷治癒および上皮細胞増殖）

本発明のなおさらなる局面に従って、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストを、治療目的のため、例えば、創傷治癒の目的のために上皮細胞増殖および基底ケラチノサイトを刺激するため、ならびに毛包産生および皮膚創傷の治癒を刺激するために、利用するためのプロセスが提供される。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、以下を含む創傷治癒を刺激することにおいて臨床的に有用であり得る：外科的創傷、切除の創傷、深い創傷（真皮および表皮の損傷を含む）、眼組織の創傷、歯の組織の創傷、口腔の創傷、糖尿病性潰瘍、皮膚の潰瘍、肘の潰瘍、動脈性の潰瘍、静脈うっ滞潰瘍、熱への曝露または化学物質による熱傷、および他の異常な創傷治癒状態（例えば、尿毒症、栄養失調、ビタミン欠乏、ならびにステロイド、放射能療法および抗腫瘍性薬物および代謝拮抗物質を用いる全身性処置に関連する合併症）。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、皮膚の欠失後の皮膚の回復を促進するために使用され得

る。

【0403】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、創傷床 (wound bed) への皮膚移植片の付着を増大するため、および創傷床からの再上皮形成を刺激するために使用され得る。以下は、スタニオカルシンポリヌクレオチドまたはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストまたはスタニオカルシンアンタゴニストが創傷床への付着を増大するために使用され得る、移植片の型である：自家移植片、人工皮膚、同種移植片 (allograft)、自己植皮片、自己表皮移植片 (autoepidermic graft)、無血管性 (avascular) 移植片、ブレア - ブラウン移植片、骨移植片、胚胎組織移植片、真皮移植片、遅延移植片、皮膚移植片、表皮移植片、筋膜移植片、全層皮膚移植片、異種移植片 (heterologous graft)、異種移植片 (xenograft)、同種移植片 (homologous graft)、増殖性移植片、層板状の移植片、網状移植片、粘膜移植片、オリエ - ティールシュ移植片、大網移植片 (omental graft)、パッチの移植片、茎状移植片、全層移植片 (penetrating graft)、分層植皮片、分層皮膚移植片。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、皮膚の強度を助長するため、および高齢の皮膚の外見を改善するために使用され得る。

【0404】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストはまた、肝細胞増殖、および肺、乳房、膵臓、胃、小腸 (small intestine)、および大腸における上皮細胞増殖における変化を生じると考えられる。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、上皮細胞 (例えば、皮脂細胞 (sebocyte)、毛包、肝実質細胞、肺

胞上皮細胞II型 (type II pneumocyte)、ムチン産生杯細胞、および他の上皮細胞、ならびに皮膚、肺、肝臓、および胃腸管内に含まれるそれらの先祖)の増殖を促進し得る。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、内皮細胞、ケラチノサイト、および基底ケラチノサイトの増殖を促進し得る。

【0405】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストはまた、照射、化学療法処置またはウイルス感染から生じる腸の毒性の副作用を低減するために使用され得る。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、小腸粘膜上で細胞保護的な効果を有し得る。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストはまた、化学療法およびウイルス感染から生じる粘膜炎 (mucositis) (口粘膜) の治癒を刺激し得る。

【0406】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、熱傷を含む、完全なおよび部分的な厚さの皮膚欠損における皮膚の十分な再生 (すなわち、毛包、汗腺、および皮脂腺の再増殖)、乾癬のような他の皮膚欠損の処置においてさらに使用され得る。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、表皮水疱症、これらの損傷の再上皮形成を促進することによる頻繁な開放性かつ疼痛性の水疱を生じる内在的な真皮への表皮の接着における欠損を処置するために使用され得る。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストはまた、胃潰瘍および十二指腸潰瘍を処置

し、そして粘膜の内層の癒痕形成ならびにより迅速な腺の粘膜および十二指腸の粘膜の内層の再生による治癒を助けるために使用され得る。炎症性腸疾患（例えば、クローン病および潰瘍性大腸結腸炎）は、それぞれ、小腸または大腸の粘膜表面の崩壊を生じる疾患である。従って、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、粘膜表面の再表面化（*resurfacing*）を促進して、より迅速な治癒を助けるため、および炎症性腸疾患の進行を予防するために、使用され得る。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストを用いる処置は、胃腸管全体の粘膜の産生に対して有意な効果を有することが予測され、そして腸粘膜を、摂取されたかまたは外科手術後の有害な物質から保護するために使用され得る。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、本発明のポリヌクレオチドの発現下に関連する疾患を処置するために使用され得る。

【0407】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、種々の病的状態に起因する肺への損傷を予防および治癒するために使用され得る。増殖因子（例えば、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニスト）は、急性または慢性の肺損傷を予防または処置するために、増殖および分化を刺激し得、そして肺胞および気管支（*bronchiolar*）上皮の修復を促進し得る。例えば、気管支上皮および肺胞（*alveoli*）の壊死を生じる、気腫（これは、肺胞の進行性の損失を生じる）および吸入損傷（すなわち、煙の吸入および熱傷から生じる）は、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、およびスタニオカルシンアゴニストまたはスタニオカルシンアンタゴニストを使用して効果的に処置され得る。また、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリ

ペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、肺胞上皮細胞ⅠⅠ型の増殖および分化を刺激するために使用され得、これは、未熟な乳児における硝子膜疾患（例えば、乳児呼吸窮迫症候群および気管支肺異形成症）のような疾患を処置または予防することを助け得る。

【0408】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、肝実質細胞の増殖および分化を刺激し得、そして従って、肝臓疾患および病状（例えば、肝硬変により生じる劇症肝不全、肝炎ウイルスおよび毒性物質（すなわち、アセトアミノフェン、四塩化炭素（carbon tetrachloride）、および他の当該分野で公知の肝臓毒素）により生じる肝臓損傷）を緩和または処置するために使用され得る。

【0409】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、真性糖尿病の発症を処置または予防するために使用され得る。新たにⅠ型糖尿病およびⅠⅠ型糖尿病と診断された患者において、いくつかの島細胞機能が残っている場合、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、その疾患の持続性の発現を緩和、遅延または予防するように、その島機能を維持するために使用され得る。また、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストまたはスタニオカルシンアンタゴニストは、島細胞機能を改善または促進するための島細胞移植における補助として使用され得る。

【0410】

（感染性疾患）

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、感染因子を処置、または検出するために用いられ得る。例えば、免疫応答を上昇させ

ることによって、特にB細胞および/またはT細胞の増殖および分化を増加させることによって、感染性疾患が処置され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を上昇させるか、または新たな免疫応答を開始させるかのいずれかにより上昇され得る。あるいは、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストはまた、必ずしも免疫応答を誘発することなく、感染因子を直接阻害し得る。

【0411】

ウイルスは、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストにより処置または検出され得る疾患または症状を引き起こし得る感染因子の一例である。ウイルスの例としては、以下のDNAおよびRNAのウイルスおよびウイルス科が挙げられるがこれらに限定されない：アルボウイルス、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アルテリウイルス、ビルナウイルス科、ブイヤウイルス科、カルシウイルス科、サルコウイルス科(Circoviridae)、コロナウイルス科、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科(肝炎)、ヘルペスウイルス科(例えば、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、ヘルペス帯状疱疹)、モノネガウイルス(Mononegavirus)(例えば、パラミクソウイルス科、麻疹ウイルス、ラブドウイルス科)、オルソミクソウイルス科(例えば、インフルエンザ)、パピローマウイルス、パポバウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科(例えば、痘瘡またはワクシニア)、レオウイルス科(例えば、ロタウイルス)、レトロウイルス科(HTLV-I、HTLV-II、レンチウイルス)、およびトガウイルス科(例えば、ルビウイルス属)。これらの科内に入るウイルスは、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：関節炎、細気管支炎(bronchiolitis)、脳炎、眼性感染症(例えば、結膜炎、角膜炎)、慢性疲労症候群、肝炎(A型、B型、C型、E型、慢性活動性、デルタ)、髄膜炎、日和見感染症(例えば、AIDS)、肺炎、バーキットリンパ腫、水痘、出血熱、麻疹、流行性耳下腺炎、パラインフルエンザ、狂犬病、感冒、ポリオ

、白血病、風疹、性感染症、皮膚病（例えば、カポジ、いぼ）、およびウイルス血症。スタニオカルシンポリペプチドもしくはスタニオカルシンポリヌクレオチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患が処置または検出され得る。

【0412】

同様に、疾患または症状を引き起こし得、かつスタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストによって処置または検出され得る細菌性因子あるいは真菌性因子は、以下のグラム陰性細菌科およびグラム陽性細菌科ならびに真菌を含むがこれらに限定されない：Actinomycetales（例えば、Corynebacterium、Mycobacterium、Nocardia）、Aspergilloles、Bacillaceae、Bacteroidaceae、Blastomycosis、Bordetella、Borrelia（例えば、Borrelia burgdorferi）、Brucellosis、Candidiasis、Campylobacter、Coccidioidomycosis、Cryptococcosis、Dermatocycoses、Enterobacteriaceae（Klebsiella、Salmonella、Serratia、Yersinia）、Erysipelothrix、Helicobacter、Legionellosis、Leptospirosis、Listeria、Mycoplasmatales、Neisseriaceae（例えば、Acinetobacter、Gonorrhea、Menigococcal）、Pasteurellaceaeの感染症（例えば、Actinobacillus、Haemophilus、Pasteurella）、Pseudomonas、Rickettsiaceae、Chlamydiaceae、Syphilis、ならびにStreptococcal。これらの細菌または真菌の科は、以下を含むがこれらに限定されない疾患または症状を引き起こし得る：菌血症、心内膜炎、眼感染症（結膜炎、結核、ブドウ膜炎）、歯肉炎、日和見感染症（例えば、AIDSに関連した感染症）、爪周囲炎、プロテアーゼ関連感染症、ライター

病、気道感染症（例えば、百日咳または蓄膿症）、敗血症、ライム病、ネコ引っ掻き病、赤痢、パラチフス熱、食中毒、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎、クラミジア、梅毒、ジフテリア、ライ病、パラ結核、結核、狼瘡、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿痂疹、リウマチ熱、猩紅熱、性感染症、皮膚病（例えば、蜂巣炎、皮膚真菌症（*dermatocycoses*））、毒血症、尿路感染症、創傷感染症。スタニオカルシンポリペプチドもしくはスタニオカルシンポリヌクレオチド、スタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状もしくは疾患を処置または検出し得る。

【0413】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストにより処置または検出され得る、寄生生物性因子が引き起こす疾患または症状としては以下のファミリーが挙げられるがこれらに限定されない：アメーバ症、バベシア症、コクシジウム症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症（*Dientamoebiasis*）、交疫、外部寄生生物性、ジアルジア鞭毛虫症、蠕虫症、リーシュマニア症、タイレリア症、トキソプラズマ症、トリパノソーム症、およびトリコモナス（*Trichomonas*）症。これらの寄生生物は、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：疥癬、ツツガムシ病、眼性感染症、腸疾患（例えば、赤痢、ジアルジア鞭毛虫症）、肝臓疾患、肺疾患、日和見感染症（例えば、AIDS関連）、マラリア、妊娠合併症、およびトキソプラズマ症。スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患を処置または検出し得る

好ましくは、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、患者に有効量のポリペプチドを投与するか、または患者から細胞を取り出して、スタニオカルシンポリヌクレオチドをこの細胞に供給し、そして操作した細胞を患者に戻す（エキソビボ治療）かのいずれかによるものであり得

る。さらに、スタニオカルシンポリペプチドまたはスタニオカルシンポリヌクレオチドはワクチン中の抗原として用いられて、感染性疾患に対する免疫応答を惹起し得る。

【0414】

(再生)

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストを用いて、細胞を分化させ、増殖させ、そして誘引して、組織の再生を導き得る (Science 276:59-87(1997)を参照のこと)。組織の再生を用いて、先天性欠損、外傷(創傷、熱傷、切開、または潰瘍)、加齢、疾患(例えば、骨粗鬆症、変形性関節炎(osteoarthritis)、歯周病、肝不全)、美容形成手術を含む手術、線維症、再灌流傷害、もしくは全身性サイトカイン損傷により損傷を受けた組織を修復、置換、または保護し得る。

【0415】

本発明を用いて再生し得る組織としては、以下が挙げられる：器官(例えば、脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮)、筋肉(平滑筋、骨格筋、または心筋)、血管系(血管およびリンパ管を含む)、神経、造血、および骨格(骨、軟骨、腱、および靭帯)の組織。好ましくは、再生は、瘢痕なく、または瘢痕が低減されて生じる。再生はまた、新脈管形成を含み得る。

【0416】

さらに、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、治癒するのが困難な組織の再生を増加させ得る。例えば、腱/靭帯の再生を増大させることによって、損傷後の回復時間が早まる。本発明のスタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストはまた、損傷を回避する試みにおいて予防的に使用され得る。処置され得る特定の疾患は、腱炎、手根管症候群、および他の腱欠損または靭帯欠損を含む。非治癒創傷の組織再生のさらなる例としては、褥瘡性潰瘍、脈管不全、外科的創傷、および外傷性

創傷に関連する潰瘍が挙げられる。

【0417】

同様に、神経および脳組織はまた、神経細胞を増殖および分化させるためにスタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストを使用することによって再生され得る。本方法を用いて処置または検出され得る疾患としては、中枢神経系疾患および末梢神経系疾患、神経障害、または機械的および外傷性の疾患（例えば、脊髄障害、頭部外傷、脳血管疾患、および発作（stroke））が挙げられる。詳細には、末梢神経傷害と関連する疾患、末梢神経障害（例えば、化学療法または他の医学的療法から生じる）、局在神経障害、および中枢神経系疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、およびシャイ-ドレーガー症候群）はすべて、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチドまたはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストを用いて処置または検出され得る。

【0418】

（走化性）

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチドまたはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、走化性活性を有し得る。走化性分子は、細胞（例えば、単球、線維芽細胞、好中球、T細胞、肥満細胞、好酸球、上皮細胞および/または内皮細胞）を、身体中の特定の部位（例えば、炎症、感染、または過剰増殖の部位）に誘引または動員する。次いで、動員された細胞は、特定の外傷または異常性を撃退および/または治癒し得る。

【0419】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチドまたはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、特定の細胞の走化性活性を増大し得る。次いで、これらの走化性分子を使用して、身体中の特定の位置に標的化した細胞の数を増加させることによって、炎症、

感染、過剰増殖性の疾患、または任意の免疫系障害を処置し得る。例えば、走化性分子を使用して、傷害を受けた位置に免疫細胞を誘引することによって、組織に対する創傷および他の外傷を処置し得る。走化性分子としてスタニオカルシンはまた、線維芽細胞を誘引し得、これは創傷を処置するために使用され得る。

【0420】

スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチドまたはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストが走化性活性を阻害し得ることもまた意図される。これらの分子はまた、疾患を処置、するために使用され得る。従って、スタニオカルシンポリヌクレオチドもしくはスタニオカルシンポリペプチド、またはスタニオカルシンアゴニストもしくはスタニオカルシンアンタゴニストは、走化性のインヒビターとして使用され得る。

【0421】

(結合活性)

スタニオカルシンポリペプチドは、このスタニオカルシンに結合する分子、またはこのスタニオカルシンが結合する分子についてスクリーニングするために使用され得る。このスタニオカルシンとこの分子との結合は、結合したスタニオカルシンまたは分子の活性を活性化(アゴニスト)、増大、阻害(アンタゴニスト)、または減少させ得る。そのような分子の例としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質(例えば、レセプター)、または低分子が挙げられる。

【0422】

好ましくは、この分子は、スタニオカルシンの天然のリガンド(例えば、リガンドのフラグメント)、または天然の基質、リガンド、構造的模倣物、もしくは機能的模倣物に密接に関連する(Coliganら、Current Protocols in Immunology 1(2):第5章(1991)を参照のこと)。同様に、この分子は、スタニオカルシンが結合する天然のレセプター、または少なくとも、スタニオカルシン(例えば、活性部位)によって結合され得るレセプターのフラグメントに密接に関連し得る。いずれの場合においても、この分子は、公知の技術を用いて合理的に設計され得る。

【0423】

好ましくは、これらの分子についてのスクリーニングは、分泌タンパク質としてかまたは細胞膜上のいずれかでスタニオカルシンを発現する適切な細胞を産生する工程を包含する。好ましい細胞としては、哺乳動物、酵母、*Drosophila*、または*E. coli*由来の細胞が挙げられる。次いで、このポリペプチドを発現する細胞（または、発現されたポリペプチドを含む細胞膜）を、好ましくは、スタニオカルシンまたはこの分子のいずれかの結合、活性の刺激、または活性の阻害を観察するための分子を潜在的に含む試験化合物と接触させる。

【0424】

アッセイは、スタニオカルシンへの候補化合物の結合を単純に試験し得、ここで結合は、標識によって、または標識された競合物との競合に関するアッセイにおいて検出される。さらに、アッセイは、候補化合物がスタニオカルシンへの結合によって生成されるシグナルを生じるか否かを試験し得る。

【0425】

あるいは、アッセイは、無細胞調製物、固体支持体に接着されたポリペプチド/分子、化学ライブラリー、または天然産物の混合物を用いて実施され得る。アッセイはまた、候補化合物を、スタニオカルシンを含む溶液と混合する工程、ポリペプチド/分子の活性または結合を測定する工程、およびスタニオカルシン/分子の活性または結合を、標準と比較する工程を単純に包含し得る。

【0426】

好ましくは、ELISAアッセイは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて、サンプル（例えば、生物学的サンプル）におけるスタニオカルシンのレベルまたは活性を測定し得る。抗体は、スタニオカルシンへの直接的もしくは間接的のいずれかの結合、または基質についてのポリペプチドとの競合によって、スタニオカルシンのレベルまたは活性を測定し得る。

【0427】

さらに、本発明のスタニオカルシンが結合するレセプターは、当業者に公知の多くの方法（例えば、リガンドパニングおよびFACSソーティング（*Coli g an*ら、*Current Protocols in Immun.*, 1(2

）、第5章（1991））によって同定され得る。例えば、発現クローニングは、ポリアデニル化RNAがこのポリペプチドに应答する細胞から調製される場合に用いられ、例えば、NIH3T3細胞（これは、FGFファミリータンパク質に対する複数のレセプターを含むことが公知である）、およびSC-3細胞、およびこのRNAから作製されたcDNAライブラリーは、プールに分けられ、そしてこのポリペプチドに应答性でないCOS細胞または他の細胞をトランスフェクトするために使用される。ガラススライド上で増殖しているトランスフェクトされた細胞は、それらを標識化した後に、本発明のポリペプチドに曝露される。このポリペプチドは、種々の手段（部位特異的プロテインキナーゼに対する認識部位のヨウ素化または封入を含む）によって標識化され得る。

【0428】

固定化およびインキュベーション後、スライドは、オートラジオグラフィ分析に供される。陽性プールを同定し、そしてサブプールを、反復性のサブプール化および再スクリーニングプロセスを使用して調製および再びトランスフェクトして、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生じる。

【0429】

レセプター同定のための代替のアプローチとして、標識ポリペプチドは、レセプター分子を発現する調製物を、細胞膜と光親和性に連結し得るか、または抽出し得る。架橋された材料は、PAGE分析によって分離され、そしてX線フィルムに曝露される。ポリペプチドのレセプターを含む標識複合体が切り出され得、ペプチドフラグメントへと分離され得、そしてタンパク質微量配列決定に供され得る。微量配列決定から得られるアミノ酸配列を使用して、1組の縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計してcDNAライブラリーをスクリーニングし、推定レセプターをコードする遺伝子を同定する。

【0430】

さらに、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エクソンシャッフリング、および/またはコドンシャッフリングの技術（集合的に「DNAシャッフリング」という）を利用して、スタニオカルシンの活性を調節し得、それによってスタニオカルシンのアゴニストおよびアンタゴニストを効果的に生成する。

一般に、米国特許第5,605,793号、同第5,811,238号、同第5,830,721号、同第5,834,252号、および同第5,837,458号、ならびにPatten, P. A.ら、Curr. Opin. Biotechnol. 8:724~33(1997); Harayama, S. Trends Biotechnol. 16(2):76~82(1998); Hansson, L. O.ら、J. Mol. Biol. 287:265~76(1999); ならびにLorenzo, M. M. およびBlasco, R. Biotechniques 24(2):308~13(1998) (これらの特許および刊行物の各々は、本明細書において参考として援用される)を参照のこと。

1つの実施態様において、スタニオカルシンポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変更は、DNAシャッフリングによって達成され得る。DNAシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的な組換えによる、2つ以上のDNAセグメントの、所望のスタニオカルシンの分子への構築を含む。別の実施態様において、本発明のポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドは、組換えの前に、誤りがちな(error-prone)PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発に供することによって、変更され得る。

別の実施態様において、スタニオカルシンの1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどと組換えられ得る。好ましい実施態様において、この異種分子は、ファミリーのメンバーである。さらに好ましい実施態様において、この異種分子は、例えば、血小板由来増殖因子(PDGF)、インスリン様増殖因子(IGF-I)、トランスホーミング増殖因子(TGF- β)、表皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、TGF- β 、骨形成タンパク質(BMP)-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、アクチビンAおよびアクチビンB、デカペントプレジック(decapentaplegic)(dpp)、60A、OP-2、ドーサリン(dorsalin)、増殖分化因子(GDF)、結節(nodal)、MIS、インヒビン- β 、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 5、および神経膠由来神経栄養因子(GDNF)のような増殖因子である。

【0431】

他の好ましいフラグメントは、スタニオカルシンの生物学的に活性なスタニオカルシンフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、このポリペプチドの活性に類似の活性を示すが、必ずしも同一ではないフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または減少した所望されない活性を含み得る。

【0432】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドの作用を調節する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。このようなアッセイの例は、哺乳動物線維芽細胞、本発明のポリペプチド、スクリーニングされるべき化合物および³[H]チミジンを、線維芽細胞が通常増殖する細胞培養条件下で合わせる工程を包含する。コントロールアッセイは、スクリーニングされるべき化合物の非存在下で実施され得、そしてこの化合物の存在下での線維芽細胞の増殖の量と比較して、各々の場合における³[H]チミジンの取り込みの決定によって、この化合物が増殖を刺激するか否かを決定し得る。線維芽細胞の増殖の量は、³[H]チミジンの取り込みを測定する液体シンチレーションクロマトグラフィーによって測定される。アゴニスト化合物およびアンタゴニスト化合物の両方が、この手順により同定され得る。

【0433】

別の方法において、本発明のポリペプチドに対するレセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物は、この化合物の存在下において標識化した本発明のポリペプチドとともにインキュベートされる。次いで、この化合物がこの相互作用を増強またはブロックする能力が、測定され得る。あるいは、スクリーニングされるべき化合物の相互作用に従う既知のセカンドメッセンジャー系の応答およびスタニオカルシンレセプターが測定され、そしてこの化合物がこのレセプターに結合し、そしてセカンドメッセンジャー応答を誘発する能力を測定して、この化合物が潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する。このようなセカンドメッセンジャー系には、cAMPグアニル酸シクラーゼ、イオンチャンネルまたはホスホイノシチド加水分解が挙げられるが、これらに限定されな

い。

【0434】

これらの上記のアッセイの全ては、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。これらのアッセイを用いて発見される分子は、スタニオカルシン／分子を活性化または阻害することによって、疾患を処置または患者に特定の結果（例えば、血管増殖）をもたらすために使用され得る。さらに、アッセイは、適切に操作された細胞または組織からのスタニオカルシンの産生を阻害または増強し得る因子を発見し得る。従って、本発明は、以下の工程を含むスタニオカルシンに結合する化合物を同定する方法を包含する：（a）候補結合化合物をスタニオカルシンとともにインキュベートする工程；および（b）結合が生じたか否かを決定する工程。さらに、本発明は、以下の工程を含むアゴニスト／アンタゴニストを同定する方法を包含する：（a）候補化合物をスタニオカルシンとともにインキュベートする工程、（b）生物学的活性をアッセイする工程、および（c）スタニオカルシンの生物学的活性が改変されているか否かを決定する工程。

【0435】

また、タンパク質のポリペプチド配列に含まれる プリーツシート領域（図3および表1に開示される）を使用することによって、実験的に本発明のポリペプチドを結合する分子を同定し得る。

従って、本発明の特定の実施形態は、図3／表1に開示された各々の プリーツシート領域のアミノ酸配列を含むか、あるいはそのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のさらなる実施形態は、図3／表1に開示された プリーツシート領域の任意の組み合わせもしくは全てを含むか、あるいはそれらからなるスタニオカルシンをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のさらに好ましい実施形態は、図3／表1に開示された各々の プリーツシート領域のスタニオカルシンアミノ酸配列を含むか、あるいはそのスタニオカルシンアミノ酸配列からなるポリペプチドに関する。本発明のさらなる実施形態は、図3／表1に開示される プリーツシート領域の任意の組み合わせまたは全てを含むか、あるいはそれらからなるスタニオカルシンポリペプチドに関する。

【0436】

(アンチセンスおよびリボザイム(アンタゴニスト))

特定の実施形態において、本発明に従うアンタゴニストは、配列番号1に含まれる配列またはその相補鎖に対応する核酸および/開示されるクローンに含まれるヌクレオチド配列に対応する核酸である。1つの実施形態において、アンチセンス配列は、生物体により内部で生成され、別の実施形態において、アンチセンス配列は別々に投与される(例えば、O'Connor, Neurochem. 56:560(1991)を参照のこと)。Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)。アンチセンス技術を使用して、アンチセンスDNAもしくはRNAを通してか、または3重らせんの形成を通して遺伝子発現を制御し得る。アンチセンス技術は、例えば、Okano, Neurochem. 56:560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)に考察される。3重らせん形成は、例えば、Leeら、Nucleic Acids Research 6:3073(1979); Cooneyら、Science、241:456(1988); およびDervanら、Science、251:1300(1991)において考察される。これらの方法は、相補的なDNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。

【0437】

例えば、本発明の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'コード部分を使用して、約10~40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計し得る。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され、それにより転写およびレセプターの産生を阻害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズし、そしてmRNA分子のレセプターポリペプチドへの翻訳をブロックする。

【0438】

1つの実施形態において、本発明のスタニオカルシンアンチセンス核酸は、外来の配列からの転写により細胞内で産生される。例えば、ベクターまたはその一部が転写され、本発明のアンチセンス核酸(RNA)を産生する。このようなベクターは、スタニオカルシンアンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターは、それが転写されて所望のアンチセンスRNAを産生し得る限り、エピソームを保持し得るか、または染色体に組込まれ得る。このようなベクターは、当該分野において標準的な組換えDNA技術方法により構築され得る。ベクターは、脊椎動物細胞において複製および発現のために使用される、当該分野で公知のプラスミド、ウイルスなどであり得る。スタニオカルシンをコードする配列またはそのフラグメントの発現は、脊椎動物、好ましくはヒト細胞において作用する、当該分野で公知の任意のプロモーターにより得る。そのようなプロモーターは、誘導性または構成性であり得る。このようなプロモーターは、SV40初期プロモーター領域(Bernoi stおよびChambon、Nature、29:304-310(1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター(Yamamotoら、Cell、22:787-797(1980))、ヘルペスチミジンプロモーター(Wagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1441-1445(1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinsterら、Nature、296:39-42(1982))などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0439】

本発明のアンチセンス核酸は、少なくともスタニオカルシン遺伝子のRNA転写物の一部に相補的な配列を含む。しかし、完全に相補的であることは好ましいが、必要ではない。本明細書中で言及される「少なくともRNAの一部に相補的な」配列は、RNAとハイブリダイズし得るに十分な相補性を有し、安定な二重鎖を形成する配列を意味し；従って、スタニオカルシンの二本鎖アンチセンス核酸の場合において、二重鎖DNAの一本鎖が試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセ

ンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、スタニオカルシンのRNA配列とのより多くの塩基ミスマッチを含み得、これは、安定な二重鎖（または三重鎖の場合もあり得る）を含み得、そしてなお形成し得る。当業者は、ハイブリダイズ複合体の融点を決定するために標準的な手順を使用することによりミスマッチの許容の程度を確認し得る。

【0440】

メッセージの5'末端に相補的であるオリゴヌクレオチド（例えば、AUG開始コドンまででかつAUG開始コドンを含む5'非翻訳配列）は、翻訳の阻害の際に最も効率的に働くべきである。しかし、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列は、同様にmRNAの翻訳を阻害する際に有効であることが示された。一般的に、Wagner, R., Nature 372:333-35 (1994)を参照のこと。従って、図1A-Bに示されるスタニオカルシンの5'-または3'-の非翻訳非コード領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性スタニオカルシンmRNAの翻訳を阻害するアンチセンスアプローチに使用され得る。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補物を含むべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳のあまり効率的でないインヒビターであるが、本発明に従って使用され得る。スタニオカルシンmRNAの5'領域、3'領域またはコード領域にハイブリダイズするように設計されるか否かにかかわらず、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチド長であるべきであり、そして好ましくは6~約50ヌクレオチド長にわたるオリゴヌクレオチドである。特定の局面において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも50ヌクレオチドである。

【0441】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、もしくはRNA、またはキメラ混合物、あるいはそれらの誘導体もしくは改変バージョン、一本鎖、または二本鎖であり得る。このオリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で改変されて、例えば、分子の安定性、ハイブリダーゼーションなどを改善し得る。

このオリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基（例えば、インビボにおいて宿主細胞レセプターを標的化するために）、または細胞膜を通した輸送を促進する因子（例えば、Letsingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-56(1989); Lemaitreら、Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652(1987); PCT公開番号WO88/09810を参照のこと）、または血液脳関門（例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと）、ハイブリダイゼーション誘引切断剤（hybridization-triggered cleavage agent）（例えば、Krolら、BioTechniques、6:958-976(1988)を参照のこと）、またはインターカレート剤（例えば、Zon, Pharm. Res. 5:539-549(1988)を参照のこと）を含み得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダーゼーション誘引架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘引切断剤など）に結合体化され得る。

【0442】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの改変された塩基部分を含み得、この塩基部分は、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される：5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイブトキソシン(wybutoxosine)、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、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル) ウラシル、(a c p 3) w、および 2 , 6 - ジアミノプリン。

【0443】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの改変された糖部分を含み得る：アラビノース、2 - フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソース。

【0444】

さらなる別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの改変されたリン酸骨格を含む：ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミデート (phosphoramidate)、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタール (formacetal) またはそれらのアナログ。

【0445】

さらに別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、a - アノマーオリゴヌクレオチドである。a - アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的なRNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、通常のb - ユニットとは反対に、その鎖は互いに平行に延びる (Gautierら、1987、Nucleic Acids Res.、15:6625-6641)。このオリゴヌクレオチドは、2' - O - メチルリボヌクレオチドであるか (Inoueら、1987、Nucleic Acids Res.、15:6131-6148)、またはキメラRNA - DNAアナログである (Inoueら、1987、FEBS Lett. 215:327-330)。

【0446】

本発明のポリヌクレオチドは当該分野で公知の標準的な方法 (例えば、自動DNA合成機 (このような装置はBiosearch, Applied Bios

y s t e m s などから市販されている)の使用により)により合成され得る。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinらの方法(1988、Nucl. Acids Res. 16:3209)により合成され得、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、コントロールドポアガラス(controlled pore glass)ポリマー支持体(Sarinら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:7448-7451)などの使用により調製され得る。

【0447】

一方、スタニオカルシンをコードするコード領域配列に相補的なアンチセンスヌクレオチドが、使用され得、転写された非翻訳領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドが最も好ましい。

【0448】

本発明に従う潜在的なアンタゴニストはまた、触媒RNA、すなわちリボザイムを含む(例えば、1990年10月4日に公開された国際出願公開番号WO 90/11364; Sarverら、Science 247:1222-1225(1990)を参照のこと)。部位特異的な認識配列でmRNAを切断するリボザイムは、スタニオカルシンをコードするmRNAを破壊するために使用され得るが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接境域によって指示される位置においてmRNAを切断する。唯一の要件は、標的mRNAが以下の2つの塩基配列: 5' - UG - 3' を有することである。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および作製は、当該分野において周知であり、そしてHaseloffおよびGerlach、Nature 334:585-591(1988)においてより十分に記載される。スタニオカルシン(図1A~B)をコードするヌクレオチド配列中において、多数の潜在的なハンマーヘッド型リボザイム切断部位が存在する。好ましくは、リボザイムは、切断認識部位が、スタニオカルシンmRNAの5'末端の近傍に位置するように; すなわち、効率を増大させ、そして非機能的なmRNA転写物の細胞内蓄積を最小化するように操作される。

【0449】

アンチセンスアプローチにおけるのと同様に、本発明のリボザイムは、修飾されたオリゴヌクレオチドから構成され得（例えば、安定性の改善、標的化などのために）、そしてインビボでスタニオカルシンを発現する細胞に送達されるべきである。リボザイムをコードするDNA構築物は、アンチセンスをコードするDNAの導入についての上記と同様の様式で細胞に導入され得る。送達の好ましい方法は、強力な構成的プロモーター（例えば、p o l I I I Iプロモーターまたはp o l I I Iプロモーター）の制御下でリボザイムを「コードする」DNA構築物を使用して、その結果、トランスフェクトされた細胞は、内因性スタニオカルシンメッセージを破壊し、そしてこれらの翻訳を妨害するのに十分な量のリボザイムを産生することを包含する。リボザイムは、アンチセンス分子とは違って触媒性であるので、より低い細胞内濃度が効率のために必要である。

【0450】

アンタゴニスト/アゴニスト化合物を利用して、腫瘍性の細胞および組織上での本発明のポリペプチドの細胞増殖 (g r o w t h) および増殖 (p r o l i f e r a t i o n) 効果を阻害し得る。すなわち、腫瘍の新脈管形成を刺激し、それにより異常な細胞成長および増殖を（例えば、腫瘍の形成または増殖において）遅延または防止する。

【0451】

アンタゴニスト/アゴニストをまた利用して、血管過多の疾患をも予防し得、そして水晶体嚢外白内障 (e x t r a c a p s u l a r c a t a r a c t) 手術後の上皮レンズ細胞の増殖をも予防する。本発明のポリペプチドのミトジェン活性の防止はまた、例えば、バルーン血管形成術後の再狭窄のような場合に要求され得る。

【0452】

アンタゴニスト/アゴニストをまた利用して、創傷治癒の間の瘢痕組織の増殖をも予防し得る。

【0453】

アンタゴニスト/アゴニストをまた利用して、本明細書中に記載される疾患をも処置し得る。

【0454】

(他の活性)

本発明のポリペプチドは、血管内皮細胞増殖を刺激する能力の結果として、種々の疾患状態（例えば、血栓症、動脈硬化、および他の心臓血管の状態）に起因する虚血組織の血管再生を刺激するための処置において利用され得る。これらのポリペプチドをまた利用して、上記で議論されるように新脈管形成および肢の再形成を刺激し得る。

【0455】

本発明のポリペプチドをまた、傷害、熱傷、手術後組織修復、および瘢痕に起因する創傷の処置にも利用し得る。なぜなら、それらは異なる起源の種々の細胞（例えば、線維芽細胞および骨格筋細胞）に対してミトジェン性であり、それゆえダメージを受けた組織または疾患組織の修復または置換を促進する能力を有するからである。

【0456】

本発明のポリペプチドをまた使用して、ニューロンの成長を刺激し、そして特定のニューロンの障害または神経変性状態（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、およびAIDS関連複合体）において生じるニューロンのダメージを処置および予防し得る。スタニオカルシンは、軟骨細胞増殖を刺激する能力を有し得、それゆえ、骨および歯周の再形成を増強し、そして組織移植片または骨の移植片における補助のために利用され得る。

【0457】

本発明のポリペプチドをまた利用して、ケラチノサイト増殖を刺激することにより、日焼けに起因する皮膚の老化を予防し得る。

【0458】

スタニオカルシンポリペプチドはまた、毛の損失を予防するために使用され得る。なぜなら、FGFファミリーメンバーは、毛形成細胞を活性化し、そしてメラノサイト増殖を促進する。同じ様式で、本発明のポリペプチドを使用して、他のサイトカインと共に使用した場合に、造血細胞および骨髄細胞の増殖および分化を刺激し得る。

【0459】

スタニオカルシンポリペプチドをまた利用して、移植前の器官を維持し得るか、または初代組織の細胞培養を支持するために使用し得る。

【0460】

スタニオカルシンポリペプチドはまた、初期胚における分化のための中胚葉起源の組織を誘導するために利用され得る。

【0461】

スタニオカルシンポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストはまた、先に議論されるように、造血系統に加えて胚性幹細胞の分化または増殖を増加または減少し得る。

【0462】

スタニオカルシンポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストはまた、哺乳動物の特徴（例えば、身長、体重、毛の色、眼の色、皮膚、脂肪組織の割合、色素沈着、大きさ、および形（例えば、美容外科））を調節するために使用され得る。同様に、スタニオカルシンポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、異化作用、同化作用、プロセッシング、利用、およびエネルギーの貯蔵に影響を及ぼす哺乳動物の代謝を調節するために使用され得る。

【0463】

スタニオカルシンポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにスタニオカルシンのアゴニストまたはアンタゴニストは、バイオリズム、カリカディック（*caricadic*）リズム、うつ病（抑うつ性障害を含む）、暴力の傾向、痛みへの耐性、生殖能力（好ましくは、アクチビンまたはインヒビン様活性によって）、ホルモンレベルもしくは内分泌レベル、食欲、性欲、記憶、ストレス、または他の認知の質に影響を及ぼすことによって、哺乳動物の精神状態または身体状態を変更するために使用され得る。

【0464】

スタニオカルシンポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにスタニオカ

ルシンのアゴニストまたはアンタゴニストはまた、例えば、貯蔵能力、脂肪含有量、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子、または他の栄養成分を増加または減少させるような食品添加物または保存剤として使用される。

【0465】

上記に列挙される用途は、広範な種々の宿主において使用される。このような宿主としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ヒト、ネズミ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ミニブタ (micro pig)、ニワトリ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒト。特定の実施形態において、宿主は、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ニワトリ、ラット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌまたはネコである。好ましい実施形態において、宿主は哺乳動物である。最も好ましい実施形態において、宿主は、ヒトである。

【0466】

本発明を一般的に記載してきたが、同じことが、以下の実施例を参照してより容易に理解される。これらの実施例は、例示目的で提供され、限定するものとして意図されない。

【0467】

本発明を一般的に記載してきたが、同じことが、以下の実施例を参照してより容易に理解される。これらの実施例は、例示目的で提供され、限定するものとして意図されない。

【0468】

(実施例)

(実施例1：スタニオカルシン (STC) は低酸素状態の損傷効果から神経細胞を保護する)

本実施例は、組換えスタニオカルシンでの培養神経細胞の処理が、それらのリン酸の取り込みを刺激したことを開示する。スタニオカルシン cDNA のトランスフェクションによるスタニオカルシンの発現は、低酸素ストレスに対する、およびタプシガルジンでの処理によって誘導される細胞内カルシウムの動員に対す

る、増加された耐性を付与した。スタニオカルシン発現の上方制御された細胞内再分配が、梗塞された領域における「半影」として、ヒトおよびラットの脳ニューロンに見られた。まとめて考えると、これらの知見は、スタニオカルシンが、虚血およびカルシウム媒介細胞死によってチャレンジされた最終分化されたニューロン細胞の完全性の、維持および保護における重要な役割を果たすことを示す。

【0469】

(方法)

(細胞培養および試薬)

Paju細胞株(Paju/WT)を、本発明者の実験室において、広範に拡がった転移性神経堤由来腫瘍を有する16歳の少女の胸膜液から確立した。この細胞は、RPMI-1640培地(10%ウシ胎仔血清、ペニシリンG(50mg/ml)、硫酸ストレプトマイシン(50mg/ml)、および1mM グルタミンを補充した)において増殖し、表面に接着する。

【0470】

継代培養のために、細胞を、0.5M EDTAでの処理によって脱着させた。ヒト組換えスタニオカルシン(hSTC)およびhSTCに対するウサギ抗血清を、上記のように調製した。タブシガルジンを、Calbiochem(Calbiochem-Novabiochem Corp. La Jolla, CA, USA)から購入した。

【0471】

(細胞生存度アッセイおよびATPモニタリングのためのルシフェラーゼアッセイ)

細胞生存度アッセイを、トリパンブルー排除によってアッセイした(BDH Chemicals, England)。ATPを、ATPモニタリングキット(BioOrbit, Tampere, Finland)によって、製造業者の指示書に従い、定量した。手短には、細胞を、1% Triton X-100を含むルシフェラーゼ緩衝液中で溶解し、そしてATP依存活性を、ルミノメーター(BioOrbit, Tampere, Finland)によってモニター

した。

【0472】

(ウエスタンブロッティング)

細胞を、20mM Tris/HCl (pH8.0)、0.2mM EDTA、3% NP40、2mM オルトバナジン酸、50mM NaF、10mM NaPPi、100mM NaClおよび各10 μ g/mlのアプロチニンおよびロイペプチンを含む氷冷緩衝液中で、10分間溶解させた。サンプルを、15分間、14000gで遠心分離し、そして上清を回収した。各サンプルの30 μ gのタンパク質を、還元条件下でSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に電気泳動的に転写した。この膜を、20mM Tris/HCl (pH8.0)、150mM NaCl、Triton X-100中の3% BSAで、2時間処理した。免疫ブロッティングを、1:1000希釈のヒトスタニオカルシン抗体に対するウサギ抗体、それに続く、抗ウサギIgに対するペルオキシダーゼ結合体二次ヤギ抗体で行った。プロットを、増強化学ルミネセンス (ECL、Amersham、UK) によって発色させた。

【0473】

(免疫組織化学)

組織を、4%緩衝化ホルムアルデヒド中に固定し、従来的に処理し、そしてパラフィン包埋した。4 μ m厚の切片を、3-アミノプロピルトリエトキシ-シラン (APES) (Sigma, St. Louis, MO, USA) をコートしたスライド上にマウントし、12時間、37 $^{\circ}$ で乾燥させた。脱パラフィン化し、そして再水和させた切片を、マイクロ波オーブン中で処理し、そしてメタノール-ペルヒドロール溶液 (無水メタノール中0.5%過酸化水素) で、室温にて30分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。免疫組織化学的染色を、記載のように行った。スタニオカルシン抗体での染色は、組換えスタニオカルシンタンパク質および正常ウサギ血清 (コントロールとして機能する) に行った (preabsorb)。

【0474】

(発現ベクター構築およびトランスフェクション)

全長オープンリーディングフレームを含むヒトスタニオカルシンcDNAを、p cDNA3発現ベクター (Invitrogen) のBamHI部位にクローン化した。Paju細胞を、Lipofectamine Reagentを用いて、製造業者 (GIBCO/BRL) の指示に従って、5 μ gのベクター構築物を用いてトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、3週間G418 (700 μ g/ml) に対する耐性について選択し、そして単一の細胞をクローン化した (Paju/STC)。コントロール細胞を、空のベクターを用いてトランスフェクトした (Paju/C)。

【0475】

(ホスフェートの取込み)

ホスフェート ($^{32}\text{P i}$) 取込みを、記載されるように、37 °Cにて、Locke's緩衝液、pH7.2 - 7.4 (5.5mM KCl、1.0mM MgCl_2 、2.5mM CaCl_2 、5.5mM グルコース、8.5mM HEPESおよび160mM NaClからなる) 中で測定した。10分間のアッセイ培地中でのプレインキュベーションの後、取込みを、125 μM $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ (200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$) を伴う200ng/mlの組換えスタニオカルシンの添加により開始させた。示された時間点で、 $^{32}\text{P i}$ 取込みを、冷停止溶液を用いる洗浄により停止させた。細胞を水中の0.1% SDSに溶解させ、そして $^{32}\text{P i}$ 活性を、液体シンチレーションにより測定した。

【0476】

(梗塞したヒトの脳のサンプル)

標本を、患者の梗塞した半球および対応する対側の脳領域から、剖検時に収集した。この患者は、虚血性発作症状の発症後の様々な時間で死亡した。このサンプルを、Helsinki Stroke Studyに記載されるように、切片化し、プロセスし、そして組織学的に分析した。

【0477】

(実験動物および巣状脳虚血の誘導)

37匹の雄性Wistarラット (体重310 ~ 380g) を用いた。

【0478】

巣状大脳虚血を、麻酔した動物の内側大脳動脈の結紮により誘導した。再灌流を結紮器を90分後に取り除くことにより達成した。コントロール動物は、同じ手順を受けたが、結紮器を、頸動脈分岐部のほんの10mm上に挿入し、そして1分後に取り除いた。虚血後の2h、6h、24h、72h、および7日後に、実験動物を麻酔し、そして200mlの0.09%生理食塩水を用いる、5分間、または灌流液の全てが透明になるまで、経心臓還流(transcardial perfusion)に供する。コントロールを、経心臓還流の24時間後偽閉塞(sham occlusion)に供する。この脳を、速やかに取り出し、2mm厚の冠状切片を、視交叉のレベルで切り出し、ホスフェート緩衝化(pH7)4%ホルムアルデヒド中に固定し、そしてパラフィンに包埋した。

【0479】

(結果：)

(上昇した細胞外 Ca^{2+} は、培養した神経細胞におけるスタニオカルシン発現を誘導する)

環境中で上昇したカルシウムが、サカナにおけるスタニオカルシン合成の主な原因である(Wangerら、Mol Cell Endocrinol., 62: 31-39 (1989))と考え、本発明者らは、Paju細胞をRPMI-1640培地(5.4mMの $CaCl_2$ または $MgCl_2$ を含む)中で培養した。スタニオカルシンタンパク質の発現は、高カルシウム培地における培養の6時間後に非常に増加し、そして12時間目にプラトーレベルに達した(図4)。Paju細胞の培養物への等モル濃度の Mg^{2+} の添加は、スタニオカルシン発現に何ら効果も有さなかった(データ示さず)。

【0480】

(STCは、培養した神経細胞におけるPi取込みを刺激する)

ヒトスタニオカルシンは、腎Naホスフェート共輸送体に作用することにより、ラット腎臓における細尿管ホスフェート再吸収を刺激することが報告されている(Wangerら、J. Bone Miner Res., 12: 165-171 (1997))。Paju/WT細胞への200ng/mlの組換えヒトスタニオカルシンの添加は、それらのPi取込みの速度を有意に増加した(図5)

。

【0481】

(STCは、低酸素症および高カルシウム血症に対する増加した耐性を与える)

CoCl₂を用いる処置は、インビトロおよびインビボの両方での低酸素症発作を模倣するために一般に用いられる。スタニオカルシンcDNAを用いるトランスフェクションの後にスタニオカルシンを過剰発現するPaju細胞(Paju/STC)、および空のベクターを用いてトランスフェクトしたコントロール細胞(Paju/C)を、300 μM CoCl₂の存在下で12時間および24時間、増殖させた。Paju/STC細胞のみが高い生存度を保った。スタニオカルシンの予防的役割を、CoCl₂の存在下で、Paju/STC細胞が、Paju/C細胞と比較して有効なATP合成を維持するという事実によりさらに実証した(図6)。

【0482】

タブシガルジン(内質小網におけるCa²⁺ATPaseのインヒビター)は、細胞内のカルシウムを動員し、貯蔵し、そして細胞内の遊離のカルシウムのレベルの増加を導く。Paju/STC細胞は、Paju/C細胞に対して有毒な濃度での、タブシガルジンを用いる処置に対して明らかに上昇した耐性を示した(図7)。

【0483】

(脳梗塞の周りのヒト頭頂皮質におけるスタニオカルシンの一過性アップレギュレートおよび再分配した神経発現)

本発明者らは、哺乳動物脳におけるスタニオカルシンの構成的発現が、ニューロンに限られ、そして免疫組織化学は、スタニオカルシン発現を核小体以外の細胞核において主に示したことを以前に報告した。本発明者らはまた、頭頂皮質の錐体細胞に類似するより大きなニューロンの細胞質、脳の海馬およびPurkinje細胞、ならびに基底核における大きなニューロンがまた、スタニオカルシンについて染色されたことを報告した(Zhangら、Am J Pathol, 153:439-45(1998))。

【0484】

虚血性発作の発症後15時間以内に死亡した患者の脳からの切片の免疫組織化学染色は、梗塞した領域に近いニューロンにおけるスタニオカルシンの明かに変化した分布を示した。対側の半球の対応する領域におけるニューロンと比較した場合、より大きな皮質ニューロンの細胞質およびニューロンプロセスにおける、突出した反応性を伴う、染色の全体の増大した強度が存在した(図8AおよびB)。スタニオカルシンのこの増大および再分布した神経染色は、3日間の虚血性梗塞を有する同側の半球の同じ位置から得られた脳切片においてはあまり明確ではなかった(図8C)。正常なウサギ血清または組換えスタニオカルシンタンパク質を用いて前吸収したスタニオカルシン抗体を用いるコントロール染色は、神経染色を与えなかった(データ示さず)。

【0485】

(ラットにおける実験的虚血性脳発作における変化したスタニオカルシン発現)

虚血に応答する大脳ニューロンにおけるスタニオカルシン発現の変化をさらに調査するために、本発明者らは、実験的一過性巣状虚血に供したラット由来の脳を研究した。虚血中心からの切片において、ニューロンにおけるスタニオカルシン染色のわずかな減少が、2時間後に既に見られ、そしてこれは、3日目に梗塞の成熟と並行して減少した。STCの再分布およびアップレギュレートした発現(ヒト脳における梗塞の15時間後に観察された発現に対応する)は、虚血中心の周りの「半影」領域において見られた。ニューロンは、スタニオカルシン(これはまた、ニューロンプロセスに転移された)についての強い、細胞質免疫反応性を示した(図9)。「半影」領域のニューロンにおけるスタニオカルシンのこの目立ちかつ再分布したパターンは、2時間および6時間で最も目立った。これは徐々に減少し、そして7日までに偽手術した動物由来または非梗塞の対側半球由来の脳の切片において観察されたパターンに戻った。このニューロンは、正常なウサギ血清、または組換えスタニオカルシンを用いて前吸収した抗体で染色されなかった(データ示さず)。

【0486】

(考察)

結果は、上昇されたスタニオカルシン発現が、低酸素症後の潜在的に有害なカルシウムレベルに対してニューロンを保護することを示す。この概念は、トランスフェクトされたスタニオカルシンを構成的に過剰発現する神経細胞が、低酸素ストレスを模倣しそしてカルシウムの流入を導く CoCl_2 での処理に対する上昇された耐性を示すという、本発明者らの知見によって支持される。STC発現細胞はまた、タブシガルジンでの処理によって達成された細胞内カルシウムの動員に対する上昇された耐性を提示した。

【0487】

Paju細胞へのインビトロでのスタニオカルシンの添加は、Piの取り込みを刺激した。さらに、スタニオカルシンを過剰発現するPaju細胞が、Piの取り込みのより高い定常状態速度を提示することが観察された(データは示さず)。Piは、細胞内遊離 Ca^{2+} を、オルガネラに対するその隔離を増加することによって干渉することが示された。これらの知見は、無機リン酸の添加が、酸化のおよび興奮毒性的発作後の急性相の間の、インビトロでのニューロン生存を増加することを実証する最近の報告(Glinnら、J Neurochem., 70:1850-58(1998))の観点から、興味深い。Glinnらは、Pi流入が、ATP合成を刺激し、そして胎児ラット脳由来の培養ニューロンのエネルギーチャージを増強することを報告した。Glinnらはまた、Piに予め曝露されたニューロンが、Pi飢餓細胞よりも、ATPのより高い定常状態レベルを有することを見出した。高いエネルギーのリン酸の上昇された貯蔵は、興奮毒性状態下でのニューロン生存を改善することが見出された。

【0488】

stcトランスフェクトされた細胞またはSTC処理細胞における、測定可能な上昇されたレベルのATPの欠失にも関わらず、Paju/STC細胞は、低酸素環境下でのATP合成を維持する、有意に上昇された能力を示した。

【0489】

従って、本明細書中に開示された知見は、STC(魚類においてカルシウムおよびリン酸の恒常性を調節することが公知)が、低酸素症または虚血によってチ

ャレンジされたニューロンの保護に寄与する、以前に特徴付けられていない神経化学的な制御機構を実証する。スタニオカルシン発現の類似のパターンは、ラットおよびヒトの発作において見いだされた。従って、本発明のスタニオカルシン組成物（すなわち、スタニオカルシンポリヌクレオチド、ポリペプチド、および/またはアゴニストもしくはアンタゴニスト）は、脳発作後の損傷の限定において補助される治療的介入に対する新規アプローチを提供する。

【0490】

上記の本明細書中の参考文献の引用は、このような参考文献が、本発明に対する先行技術であることを認めるものとして解釈されるべきではない。

【0491】

（実施例2：寄託サンプルからのスタニオカルシンcDNAクローンの単離）

2つのアプローチを使用して、寄託されたサンプルから、スタニオカルシンを単離し得る。第1に、寄託されたクローンを、当業者に公知の技術（例えば、ベクター供給者によって提供される技術または関連の刊行物もしくは特許において提供される技術）を用いて、適切な宿主（例えば、XL-1 Blue (Stratagene)）に形質転換する。形質転換体を1.5%寒天プレート（適切な選択薬剤、例えば、アンピシリンを含む）に、1プレートあたり約150の形質転換体（コロニー）の密度でプレーティングする。次いで、単一のコロニーを使用して、当業者に周知の核酸単離技術（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press）を用いて、DNAを生成する。

【0492】

あるいは、配列番号1の両端（すなわち、クローンの5'NTおよび3'NTによって囲まれる配列番号1の領域内）に由来する、17~20ヌクレオチドの2つのプライマーを合成し、そしてこれらを使用して、寄託されたcDNAプラスミドをテンプレートとして使用して、スタニオカルシンcDNAを増幅する。ポリメラーゼ連鎖反応を、慣用の条件下で、例えば、0.5µgの上記cDNAテンプレートとの反応混合物の25µl中で実施する。簡便な反応混合物は、

1.5 ~ 5 mM MgCl₂、0.01% (w/v) ゼラチン、それぞれ20 μMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、25 pmolの各プライマーおよび0.25ユニットのTaqポリメラーゼである。35サイクルのPCR(94 での変性を1分間; 55 でのアニールを1分間; 72 での伸長を1分間)を、Perkin-Elmer Cetus自動化サーマルサイクラーを用いて実施する。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、そして予想される分子量のDNAバンドを切り出し、そして精製する。PCR産物を、DNA産物をサブクローニングおよび配列決定することによって選択された配列であることを確認する。

【0493】

寄託されたクローンに存在しないかもしれないスタニオカルシン遺伝子の5'非コード部分または3'非コード部分の同定のために、いくつかの方法が利用可能である。これらの方法は、以下を含むがこれらに限定されない: フィルタープローブ探索、特異的プローブを使用するクローン富化、および当該分野で周知である5'および3'「RACE」プロトコルと類似するかまたは同一のプロトコル。例えば、5'RACEに類似する方法は、所望の全長転写物の欠けている5'末端を生成するために利用可能である(Fromont-Racineら、Nucleic Acids Res. 21(7):1683-1684(1993))。

【0494】

簡潔には、特定のRNAオリゴヌクレオチドを、全長遺伝子RNA転写物をおそらく含むRNAの集団の5'末端に連結する。連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的のスタニオカルシン遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを含むプライマーセットを使用して、スタニオカルシン全長遺伝子の5'部分をPCR増幅する。次いで、この増幅した産物を配列決定し得、そしてこれを使用して全長遺伝子を生成し得る。

【0495】

この上記の方法は、所望の供給源から単離された総RNAを用いて開始するが、ポリA+RNAを使用し得る。次いで、RNA調製物を、必要ならばホスファ

ターゼで処理して、後のRNAリガーゼ工程を妨害し得る分解または損傷RNAの5'リン酸基を排除し得る。次いで、ホスファターゼを不活化するべきであり、そしてRNAをメッセンジャーRNAの5'末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼを用いて処理するべきである。この反応は、次いでT4 RNAリガーゼを用いてRNAオリゴヌクレオチドに連結され得る、キャップ切断RNAの5'末端に5'リン酸基を残す。

【0496】

この改変型RNA調製物を、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いる、第一鎖cDNA合成のためのテンプレートとして使用する。第一鎖合成反応物を、連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを用いる、所望の5'末端のPCR増幅のためのテンプレートとして使用する。次いで、得られた生成物を配列決定し、そして分析して5'末端配列がスタニオカルシン遺伝子に属することを確認する。

【0497】

(実施例3：ヒトスタニオカルシンタンパク質の細菌発現および精製)

スタニウス小体タンパク質をコードするDNA配列(ATCC#75652)を、このスタニウス小体核酸配列の5'および3'末端に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して最初に増幅する。SphIおよびBglII制限酵素部位に対応するさらなるヌクレオチドを、それぞれ、5'および3'配列に付加した。5'オリゴヌクレオチドプライマーは、5'GACTGCATGCTCCAAACTCAGCAGTG 3'(配列番号5)を有し、SphI制限酵素部位および開始コドンから開始するスタニウス小体タンパク質コード配列の21ヌクレオチドを含み；3'配列、3'GACTAGATCTTGCACTCTCATGGGATGTGCG 5'(配列番号6)は、BglII制限部位(AGATCT)に相補的な配列およびスタニウス小体タンパク質コード配列の最後の21ヌクレオチドを含む。これらの制限酵素部位は、細菌性発現ベクター-pQE70(Qiagen, Inc. Chatsworth, CA)における制限酵素部位に対応する。pQE70は、抗生物質耐性(Amp^r)、複製の細菌起源(ori)、IPTG調節可能プロモーター(P/O)、リボソーム結合

部位 (RBS)、6-His タグおよび制限酵素部位をコードする。次いで、pQE70を、制限酵素SphIおよびBglIIで消化した。増幅した配列をpQE70中にライゲートし、そしてヒスチジントグおよびRBSをコードする配列とインフレームに挿入した。次いで、このライゲーション混合物を使用して、E. coli株M15/rep4 (Qiagen, Inc.) を形質転換した。M15/rep4は、プラスミドpREP4の複数のコピーを含み、このプラスミドは、lacIリプレッサーを発現し、かつまたカナマイシン耐性 (Kan^r) を付与する。形質転換体を、それらがLBプレート上で増殖する能力によって同定し、そしてアンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択した。プラスミドDNAを単離し、そして制限分析により確認した。所望の構築物を含むクローンを、Amp (100 µg/ml) およびKan (25 µg/ml) の両方を補充したLB培地の液体培地で一晩 (O/N) 増殖させる。このO/N培養物を用いて、1:100から1:250の比で大きな培養物を接種した。この細胞を、0.4と0.6との間の吸光度600 (O.D.⁶⁰⁰) まで増殖させた。次いで、IPTG (イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド) を最終濃度1 mMまで添加した。IPTGは、lacIリプレッサーを不活化することにより、P/Oをクリアにし、遺伝子発現の増大をもたらすことを誘導する。細胞をもう3~4時間増殖させる。次いで細胞を遠心分離 (6000 × gで20分) により採集した。この細胞ペレットを、カオトロピズム剤6 MグアニジンHCl中に溶解する。明澄化の後、6-His タグを含むタンパク質によってしっかりと結合させる条件下でニッケルキレートカラム上でのクロマトグラフィーにより、この溶液から可溶化スタニオカルシンを精製した (Hochuli, E.ら、Genetic Engineering, Principles & Methods, 12:87-98 (1990))。GnHClのタンパク質変性は、いくつかのプロトコル (Jaenicke, R. およびRudolph, R., Protein Structure - A Practical Approach, IRL Press, New York (1990)) によって達成され得る。最初に、透析工程を使用して、GnHClを除去する。あるいは、Niキレートカラムから単離された精製タンパク質を、第2のカラムに結合させ得、このカラム

上に、漸減直線勾配でGnHCLを流す。このタンパク質は、カラムに結合されながら再生され、その後、250mMイミダゾール、150mM NaCl、25mM Tris-HCl (pH7.5) および10%グリセロールを含む緩衝液で溶出される。最後に、可溶性タンパク質を、5mM 炭酸水素アンモニウムを含有する貯蔵緩衝液に対して透析する。

【0498】

(実施例4：バキュロウイルス発現系を使用するヒトスタニオカルシンのクローニングおよび発現)

全長ヒトスタニオカルシンタンパク質ATCC#75652をコードするDNA配列を、実施例2に記載のように、この遺伝子の5'および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した。

【0499】

5'プライマープライマーは、配列5' CAGTGGATCCGCCACCATTGCTCCAAAACTCAGCAGTG 3' (配列番号7)を有し、そしてBamHI制限酵素部位、それに続く、真核細胞における効率的な翻訳開始シグナルに類似する6ヌクレオチド(Kozak, M., J. Mol. Biol., 196:947-950 (1987))、その直後の、ヒトスタニウス小体遺伝子の最初の21ヌクレオチドを含む(翻訳開始コドン「ATG」に下線を付す)。

【0500】

3'プライマーは、配列5' CAGTGGTACCGGTTGTGAATAA CCTCTCCC 3' (配列番号8)を有し、そして制限エンドヌクレアーゼA sp 718の切断部位およびスタニウス小体遺伝子の3'非翻訳化配列に相補的な20ヌクレオチドを含む。このフラグメントを、エンドヌクレアーゼBamHIおよびA sp 718で消化し、次いで、1%アガロースゲルで再度精製した。このフラグメントを、F2と名付ける。

【0501】

ベクターpRG1(以下に議論される、pVL941の改変型)を、バキュロウイルス発現系を使用するヒトスタニウス小体タンパク質の発現に使用する(概

説については、Summers, M. D. および Smith, G. E. 1987、A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555を参照のこと)。この発現ベクターは、Autographa californica核多角体病ウイルス(AcMNPV)の強力なポリヘドリンプロモーター、それに続く、制限エンドヌクレアーゼBamHIおよびA sp 718の認識部位を含む。シミアンウイルス40(「SV40」)のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、E. coli由来のガラクトシダーゼ遺伝子を、ポリヘドリンプロモーター、それに続く、ポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルと同じ方向で挿入する。このポリヘドリン配列は、同時トランスフェクトされた野生型ウイルスDNAの細胞媒介相同組換えのためのウイルス配列に、両側で隣接される。多くの他のバキュロウイルスベクター(例えば、pAc373、pVL941、およびpAcIM1)がpRG1ベクターの代わりに使用され得る(Luckowら、Virology 170:31-39)。

【0502】

このプラスミドを、当該分野で公知の手段によって、制限酵素BamHIおよびA sp 718を用いて消化し、そして仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸化し得る。次いで、DNAを、市販のキット(「GeneClean」、BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.)を使用して1%アガロースゲルから単離する。このベクターDNAを、V2と名付ける。

【0503】

フラグメントF2および脱リン酸化プラスミドV2を、T4 DNAリガーゼで連結した。次いで、E. coli HB101細胞を形質転換し、酵素BamHIおよびA sp 718を使用して、ヒトスタニウス小体遺伝子を有するプラスミド(pBac-hSTC)を含む細菌を同定した。このクローニングしたフラグメント配列を、DNA配列によって確かめた。

【0504】

5 μ gのプラスミドpBac-hSTCを、1.0 μ gの市販の直線状バキュロウイルス(「BaculoGold™バキュロウイルスDNA」、Pharmingen、San Diego、CA)と共に、リポフェクション法(Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413~7417(1987))を使用して、同時トランスフェクションした。

【0505】

1 μ gのBaculoGold™ウイルスDNAおよび5 μ gのプラスミドpBac-hSTCを、50 μ lの無血清グレース培地(Grace's medium)(Life Technologies Inc.、Gaithersburg、MD)を含有する、滅菌したマイクロタイタープレートのウェル中で混合した。その後、10 μ lのLipofectinおよび90 μ lのグレース培地を添加し、混合し、そして室温で15分間インキュベートした。次に、トランスフェクション混合物を、1mlの無血清グレース培地を有する35mm組織培養プレート中に播種したSf9昆虫細胞(ATCC CRL 1711)に、滴下した。このプレートを前後に揺らし、新たに添加した溶液を混合した。次にこのプレートを27℃で5時間インキュベートした。5時間後、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして10%ウシ胎仔血清を補充した1mlのグレース昆虫培地を添加した。このプレートをインキュベーターに戻し、そして27℃での培養を4日間続けた。

【0506】

4日後、上清を回収し、そしてプラークアッセイを、SummersおよびSmith(上記に引用)によって記載されるように行った。「Blue Gal」(Life Technologies Inc.、Gaithersburg)を有するアガロースゲルを使用して、青く染まるプラークを産生するgal発現クローンの容易な単離を可能とした。(「プラークアッセイ」の詳細な説明はまた、Life Technologies Inc.、Gaithersburgによって頒布された昆虫細胞培養とバキュロウイルス学のための使用者のガイド(9~10頁)において見出され得る)。

【0507】

段階希釈の4日後、このウイルスをこの細胞に添加した。適切なインキュベーションの後に、青く染まるブランクをエッペンドルフピペットのチップを用いて捨てた。次に、組換えウイルスを含むアガーを、200 μ lのグレース培地を含むエッペンドルフチューブ中に再懸濁した。アガーを短時間の遠心分離によって除去し、そして組換えバキュロウイルスを含む上清を、35mmディッシュ中に播種された昆虫 Sf 9細胞に対して使用した。4日後、これらの培養ディッシュの上清を回収し、次に上清を4 で保存した。

【0508】

Sf 9細胞を10%の熱非働化FBSを補充したグレース培地中で増殖した。この細胞を、2の感染多重度(「MOI」)で、組換えバキュロウイルスV-hSTCを用いて感染した。6時間後、この培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを含まないSF900II培地(Life Technologies Inc.、Rockvilleより入手可能)で置き換えた。42時間後、5 μ Ciの³⁵Sメチオニンおよび5 μ Ciの³⁵Sシステイン(Amershamより入手可能)を、添加した。この細胞をさらに16時間インキュベートし、次に遠心分離によって回収し、溶解し、そして標識したタンパク質をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーによって可視化した。

【0509】

(実施例5：ジヒドロ葉酸活性を欠くチャイニーズハムスター卵巣細胞を使用するヒトスタニオカルシンタンパク質のクローニングおよび発現)

ベクターpN346を、ヒトのシュタンニウス小体タンパク質の発現のために使用する。プラスミドpN346は、プラスミドpSV2-DHFR[ATCC受託番号37146]の誘導体である。両方のプラスミドは、SV40初期プロモーターの制御下にマウスジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子を含む。これらのプラスミドでトランスフェクトしたジヒドロ葉酸活性を欠くチャイニーズハムスター卵巣細胞もしくは他の細胞を、化学療法剤メトトレキサート(MTX)を補充した選択培地(-MEM、Life Technologies)においてその細胞を増殖させることにより、選択し得る。メトトレキサートに耐性

の細胞におけるDHFR遺伝子の増幅は、十分に記載されている(例えば、Alt, F.W., Kellms, R.M., Bertino, J.R.およびSchimke, R.T., 1978, J. Biol. Chem, 253:1357~1370、Hamlin, J.L.およびMa, C. 1990, Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107~143、Page, M.J.およびSydenham, M.A. 1991, Biotechnology 第9巻:64~68を参照のこと)。漸増濃度のMTXにおいて増殖した細胞は、DHFR遺伝子の増幅の結果として、標的酵素DHFRを過剰産生することにより、この薬物に対する耐性を発生する。第2の遺伝子がDHFR遺伝子に連結されている場合、その遺伝子は、通常ともに増幅されそして過剰発現される。その遺伝子の100コピーより多くを保有する細胞株を開発することは、当該分野の到達水準である。続いて、メトトレキサートを取り除くと、細胞株は、染色体に組み込まれた増幅遺伝子を含む。

【0510】

プラスミドpN346は、目的の遺伝子の発現のための強力なプロモーター、すなわち、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復(LTR)(Cullenら、Molecular and Cellular Biology, March 1985, 438~447)およびヒトサイトメガロウイルス(CMV)の極初期遺伝子のエンハンサーから単離されたフラグメントを含む(Boshartら、Cell 41:521~530, 1985)。このプロモーターの下流は、遺伝子の組み込みを可能にする以下の単一の制限酵素切断部位である: BamHI、PvuIIおよびNruI。これらのクローニング部位の後に、このプラスミドは、3つすべてのリーディングフレーム中に翻訳終始コドンを含み、その後3'イントロンおよびラットプレプロインスリン遺伝子のポリアデニル化部位を含む。他の高効率プロモーター(例えば、ヒトアクチンプロモーター、SV40初期プロモーターもしくはSV40後期プロモーター、あるいは他のレトロウイルス(例えば、HIVおよびHTLV I)由来の長末端反復)もまた、発現のために使用し得る。mRNAのポリアデニル化のために、例えば、ヒト成長ホルモンはまたはグロビン遺伝子由来の他のシグナルも同様に、使用し得る。

【0511】

染色体中に組み込まれた目的の遺伝子を保有する安定な細胞株はまた、g p t、G 4 1 8もしくはハイグロマシンのような、選択マーカーとともに同時トランスフェクションすることにより選択し得る。最初に、1つより多くの選択マーカー（例えば、G 4 1 8 + メトトレキサート）を使用することが有利である。

【0512】

プラスミドpN346を、制限酵素B a m H Iで消化し、次いで、当該分野で公知の手順により仔ウシ腸ホスファターゼを使用して脱リン酸化した。次いで、そのベクターを1%アガロースゲルから単離した。

【0513】

ヒトシュタンニウス小体タンパク質をコードするDNA配列（ATCC番号75652）を、その遺伝子の5'配列および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した。

【0514】

5'プライマーは、配列

【0515】

【化1】

5' CAGTGGATCCGCCACCATATGCTCCAAAACTCAGCAGTG 3'

（配列番号9）を有し、そしてB a m H I制限酵素部位、続いて翻訳のための効率的シグナルに似る6ヌクレオチド（K o z a k , M .、前出）+その遺伝子の最初の21ヌクレオチドを含む（翻訳開始コドン「A T G」に下線を付す）。

【0516】

3'プライマーは、配列

【0517】

【化2】

5' CAGTGGATCCGGTTGTGAAT AACCTCTCCC 3'

(配列番号10)を有し、そして制限エンドヌクレアーゼBamHIの切断部位およびその遺伝子の3'非翻訳配列に相補的な20ヌクレオチドを含む。

【0518】

増幅フラグメントをエンドヌクレアーゼBamHIで消化し、次いで1%アガロースゲル上で精製した。

【0519】

次いで、単離したベクターおよび脱リン酸化したベクターを、T4 DNAリガーゼで連結した。次いで、E. coli HB101細胞を形質転換し、そして正確な方向で挿入されたプラスミドpN346hSTCを含む細菌を同定した。挿入された遺伝子の配列を、DNA配列決定法により確認した。

【0520】

(CHO-DHFR細胞のトランスフェクション)

活性DHFR酵素を欠くチャイニーズハムスター卵巣細胞を、トランスフェクションに使用した。発現プラスミドpN346hSTC 5 μ gを、0.5 μ gのプラスミドpSVneoとともにリポフェクション法(Felgnerら、前出)を使用して同時トランスフェクトした。プラスミドpSV2-neoは、ドミナント選択マーカであるTn5由来の遺伝子neoを含み、この遺伝子は、G418を含む一群の抗生物質に対する耐性を付与する酵素をコードする。この細胞を、1mg/mlのG418を補充したMEMに播種した。2日後、細胞をトリプシン処理し、そしてハイブリドーマクロニングプレート(Greiner, Germany)に播種し、そして10~14日間培養した。この期間の後、単一コロニーをトリプシン処理し、次いで種々の濃度のメトトレキサート(25nm、50nm、100nm、200nm、400nm)を使用して、6ウェルペトリ皿に播種した。次いで、最高濃度のメトトレキサートで増殖するクローンをなおよび高濃度のメトトレキサート(500nm、1 μ M、2 μ M、5 μ M)を含む新しい6ウェルプレートに移した。同じ手順を、クローンが100

μMの濃度で増殖するまで反復した。

【0521】

所望の遺伝子産物の発現を、ウェスタンブロット分析およびSDS-PAGEにより分析した。

【0522】

(実施例6：N末端および/またはC末端の欠失変異体の構築)

以下の一般的アプローチを使用して、N末端もしくはC末端欠失スタニオカルシン欠失変異体をクローニングし得る。一般的に、約15～25ヌクレオチドの2つのオリゴヌクレオチドプライマーが、配列番号1のポリヌクレオチドの所望の5'位および3'位に由来する。これらのプライマーの5'位および3'位は、所望のスタニオカルシンポリヌクレオチドフラグメントに基づいて決定する。開始コドンおよび終始コドンを、必要ならば、それぞれこの5'プライマーおよび3'プライマーに付加して、ポリヌクレオチドフラグメントによりコードされるスタニオカルシンポリペプチドフラグメントを発現させる。好ましいスタニオカルシンポリヌクレオチドフラグメントは、本明細書の上記「ポリヌクレオチドフラグメントおよびポリペプチドフラグメント」の節において開示されるN末端欠失変異体およびC末端欠失変異体をコードするフラグメントである。所望のベクターにおけるスタニオカルシンポリヌクレオチドフラグメントのクローニングを容易にするための制限部位を含むさらなるヌクレオチドもまた、5'プライマー配列および3'プライマー配列に付加し得る。このスタニオカルシンポリヌクレオチドフラグメントを、本明細書中に考察されるかまたは当該分野で公知の適切なPCRオリゴヌクレオチドプライマーおよび条件を使用して、ゲノムDNAまたは寄託されたcDNAから増幅する。本発明のスタニオカルシンポリヌクレオチドフラグメントによりコードされるスタニオカルシンポリペプチドフラグメントを、全長ポリペプチドと同じ一般的様式で発現および精製し得るが、慣用的な改変が、特定のフラグメントと全長ポリペプチドとの間の化学的特性および物理的特性における差異に起因して、必要であり得る。

【0523】

本発明を限定するためでなく例示するための手段として、スタニオカルシンポ

リペプチドフラグメントF - 57 ~ F - 108をコードするポリヌクレオチドを、以下のように増幅およびクローニングする。制限酵素部位を含み、続けて開始コドン、F - 57で始まるポリペプチドフラグメントのN末端部分をコードするポリヌクレオチド配列をインフレームで有する開始コドンを含む、5'プライマーを作製する。制限酵素部位を含み、続いてF - 108で終わるスタニオカルシンポリペプチドフラグメントのC末端部分をコードするポリヌクレオチド配列をインフレームで有する終始コドンを含む、相補的3'プライマーを作製する。

【0524】

増幅したポリヌクレオチドフラグメントおよび発現ベクターを、このプライマー中の部位を認識する制限酵素で消化する。次いで、消化したポリヌクレオチドとともに連結する。スタニオカルシンポリヌクレオチドフラグメントを、制限した発現ベクター中に、好ましくは、そのスタニオカルシンポリペプチドフラグメントコード領域をプロモーターから下流に配置する様式で、挿入する。その連結混合物を、標準的手順を使用しそして本明細書中の実施例に記載されるように、コンピテントE. coli細胞中に形質転換する。プラスミドDNAを耐性コロニーから単離し、そしてクローニングしたDNAの身元を、制限分析、PCRおよびDNA配列決定により確認する。

【0525】

(実施例7：スタニオカルシンのタンパク質融合物)

スタニオカルシンポリペプチドは、好ましくは、他のタンパク質に融合される。これらの融合タンパク質は、種々の適用に使用され得る。例えば、Hisタグ、HAタグ、プロテインA、IgGドメイン、およびマルトース結合タンパク質へのスタニオカルシンポリペプチドの融合は、精製を容易にする(実施例5を参照のこと; EPA 394, 827; Traunckerら、Nature、331: 84 - 86 (1988)もまた参照のこと)。同様に、IgG-1、IgG-3、およびアルブミンへの融合は、インビボでの半減期を増大させる。スタニオカルシンポリペプチドに融合した核局在化シグナルは、そのタンパク質を特定の細胞内位置へと標的化し得る。一方、共有結合ヘテロ二量体またはホモ二量体は、融合タンパク質の活性を増大または減少させ得る。融合タンパク質は

また、1つより多い機能を有するキメラ分子を作製し得る。最後に、融合タンパク質は、非融合タンパク質と比較して、融合タンパク質の可溶性および/または安定性を増大させ得る。上記の融合タンパク質の全ての型は、I g G分子へのポリペプチドの融合を概説する以下のプロトコルを改変することによって作製し得る。

【0526】

簡単には、I g G分子のヒトF c部分は、以下に記載の配列の5'末端および3'末端に広がるプライマーを使用してPCR増幅し得る。これらのプライマーはまた、発現ベクター（好ましくは、哺乳動物発現ベクター）へのクローニングを容易にする都合の良い制限酵素部位を有するべきである。

【0527】

例えば、pC4（受託番号209646）を使用する場合、ヒトF c部分は、BamHIクローニング部位に連結し得る。3' BamHI部位を破壊すべきであることに注意のこと。次に、ヒトF c部分を含有するベクターを、BamHIを用いて再び制限処理し、ベクターを線状化し、そして実施例1において記載されたPCRプロトコルによって単離したスタニオカルシンポリヌクレオチドを、このBamHI部位に連結する。ポリヌクレオチドは、終止コドンなしにクローニングするが、そうしなければ、融合タンパク質は産生されないことに注意すること。

【0528】

天然に存在するシグナル配列を、分泌タンパク質を産生するために使用する場合、pC4は、第2のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、天然に存在するシグナル配列が使用しない場合、ベクターは、異種シグナル配列を含むように改変し得る（例えば、WO 96/34891を参照のこと）。

ヒトI g G F c領域：

【0529】

【化3】

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG
 AATTCCGAGGGTGCACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGAT
 CTCCCGGACTCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTAAGCCACGAAGACCCTGAGGT
 CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGA
 GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTG
 GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAACCCCATCGA
 GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
 ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
 TCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGA
 CCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGA
 CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
 CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGTGCGACGGCCCGC
 ACTCTAGAGGAT

(配列番号4)。

【0530】

(実施例8：抗体の産生)

(A)ハイブリドーマ技術)

本発明の抗体は、種々の方法によって調製し得る。(Current Protocols, 第2章を参照のこと)。このような方法の1つの例として、スタニオカルシンを発現する細胞を、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために動物に投与する。好ましい方法において、スタニオカルシンタンパク質の調製物を調製し、そして精製して、天然の夾雑物を実質的に含まないようにする。次いで、より大きな比活性のポリクローナル抗血清を生成するために、このような調製物を、動物に導入する。

【0531】

最も好ましい方法において、本発明の抗体はモノクローナル抗体(またはそのタンパク質結合フラグメント)である。このようなモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して調製し得る(Koehlerら、Nature 256:495(1975); Koehlerら、Eur. J. Immunol. 6:511(1976); Koehlerら、Eur. J. Immunol. 6:292(1976); Hammerlingら: Monoclonal Ant

ibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 563-681頁(1981))。一般に、このような手順は、動物(好ましくはマウス)を、スタニオカルシンポリペプチドで、またはより好ましくは分泌されるスタニオカルシンポリペプチドを発現する細胞で、免疫することを包含する。このような細胞は、任意の適切な組織培養培地において培養し得るが; 10%ウシ胎仔血清(約56で非働化した)を補充し、そして約10g/lの非必須アミノ酸、約1,000U/mlのペニシリン、および約100μg/mlのストレプトマイシンを補充したEarle改変Eagle培地において細胞を培養することが好ましい。

【0532】

このようなマウスの脾細胞を抽出し、そして適切な骨髓腫細胞株と融合する。任意の適切な骨髓腫細胞株を、本発明に従って用い得る; しかし、ATCCから入手可能な親骨髓腫細胞株(SP20)を用いることが好ましい。融合後、得られるハイブリドーマ細胞を、HAT培地において選択的に維持し、次いでWandsら(Gastroenterology 80:225-232(1981))により記載されるように限界希釈によってクローニングする。次いで、このような選択を通して得られるハイブリドーマ細胞を、このスタニオカルシンポリペプチドに結合し得る抗体を分泌するプラスミドを同定するためにアッセイする。

【0533】

あるいは、スタニオカルシンポリペプチドに結合し得るさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を使用して2段階工程の手順にて生成し得る。このような方法は、抗体それ自体が抗原であり、それゆえ第二の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を使用して、動物(好ましくは、マウス)を免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を使用して、ハイブリドーマ細胞を産生する。そして、このハイブリドーマ細胞を、スタニオカルシンタンパク質特異的抗体に結合する能力がスタニオカルシンによってブロックされ得る抗体を産生するプラスミドを同定するためにスクリーニングする。このような抗体は、スタニオカルシンタンパク質特異的抗

体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そしてそれを使用して動物を免疫して、さらなるスタニオカルシタンパク質特異的抗体の形成を誘導し得る。

【0534】

本発明の抗体のFabフラグメントおよびF(ab')₂フラグメントおよび他のフラグメントを、本明細書中に開示される方法に従って使用し得ることが、理解される。このようなフラグメントを、パパイン(Fabフラグメントを産生するため)またはペプシン(F(ab')₂フラグメントを産生するため)のような酵素を使用して、タンパク質分解性切断により代表的には産生する。あるいは、分泌スタニオカルシタンパク質結合フラグメントを、組換えDNA技術の適用または合成化学を介して生成し得る。

【0535】

ヒトにおける抗体のインビボ使用のために、「ヒト化」キメラモノクローナル抗体を使用することが好ましくあり得る。このような抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝的構築物を使用して産生し得る。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野で公知である。(総説については、Morrison, Science 229:1202(1985); Oiら、BioTechniques 4:214(1986); Cabilllyら、米国特許第4,816,567号; Taniguchiら、EP 171496; Morrisonら、EP 173494; Neubergerら、WO 8601533; Robinsonら、WO 8702671; Boulianneら、Nature 312:643(1984); Neubergerら、Nature 314:268(1985)を参照のこと)。

【0536】

(b) scFvのライブラリーからのスタニオカルシンに対する抗体フラグメントの単離)

ヒトPBLから単離した天然に存在するV遺伝子を、スタニオカルシンに対する反応性を含む抗体フラグメントの大ライブラリーに構築し、このスタニオカルシンは、ドナーが曝されていて曝されていなくてもよい(例えば、米国特許第5,885,793号(その全体が参考として本明細書に援用される)を参照の

こと)。

【0537】

(ライブラリーのレスキュー)

WO 92/01047に記載のように、ヒトPBLのRNAからscFvのライブラリーを構築する。抗体フラグメントを提示するファージをレスキューするため、ファージミドを保有する約 10^9 個のE. coliを用いて、50mlの2xTY (1%グルコースおよび $100\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含有する) (2xTY-AMP-GLU)に接種し、そして振盪しながら $\text{O.D.} = 0.8$ まで増殖させる。この培養物の5mlを用いて50mlの2xTY-AMP-GLUに接種し、 2×10^8 TUの 遺伝子3ヘルパー (M13 遺伝子III、WO92/01047を参照のこと)を添加し、そして培養物を振盪なしで 37°C で45分間インキュベートし、次いで振盪しながら 37°C で45分間インキュベートする。この培養物を10分間 4000rpm で遠心分離し、そしてペレットを2リットルの2xTY ($100\mu\text{g/ml}$ アンピシリンおよび $50\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを含有する)中に再懸濁し、そして一晩増殖させる。ファージをWO92/01047に記載のように調製する。

【0538】

M13 遺伝子IIIを以下のように調製する：M13 遺伝子IIIヘルパーファージは、遺伝子IIIタンパク質をコードしない。それゆえ、抗体フラグメントを提示するファージ (ファージミド) は、抗原に対するより大きい結合アビディティーを有する。ファージ形態形成の間、野生型遺伝子IIIタンパク質を供給するpUC19誘導体を保有する細胞においてヘルパーファージを増殖させることにより、感染性M13 遺伝子III粒子を作製する。培養物を振盪なしで 37°C で1時間インキュベートし、次いで振盪しながら 37°C でさらに1時間インキュベートする。細胞を遠心沈殿 (IEC-Centra 8, 400 回転/分で10分間)し、 $100\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンおよび $25\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含有する2xTYブロス (2xTY-AMP-KAN) 300ml 中で再懸濁し、そして 37°C で振盪しながら一晩増殖させる。ファージ粒子を、2回のPEG沈殿 (Sambrookら、1990)により培養培地から精

製および濃縮し、2 ml PBSに再懸濁し、そして0.45 μmのフィルター (Minisart NML; Sartorius) を通過させ、最終濃度約 10^{13} 形質導入単位/ml (アンピシリン耐性クローン) を得る。

【0539】

(ライブラリーのパニング)

Immuntube (Nunc) を、100 μg/ml または 10 μg/ml のいずれかの本発明のポリペプチド 4 ml を用いて PBS 中で一晩被覆する。チューブを 2% Marvel - PBS を用いて 37 °C で 2 時間ブロックし、次いで PBS 中で 3 回洗浄する。約 10^{13} TU のファージをチューブに適用し、そして、回転盤上で上下にタンブリングしながら室温で 30 分間インキュベートし、次いでさらに 1.5 時間静置しておく。チューブを PBS、0.1% Tween - 20 で 10 回、そして PBS で 10 回洗浄する。1 ml の 100 mM トリエチルアミンを添加し、そして回転盤上で 15 分間上下に回転させることによりファージを溶出し、その後この溶液を 0.5 ml の 1.0 M Tris - HCl, pH 7.4 で直ちに中和する。次いで、溶出したファージを細菌とともに 37 °C で 30 分間インキュベートすることにより、ファージを用いて、10 ml の対数増殖中期の E. coli TG1 に感染させる。次いで、E. coli を 1% グルコースおよび 100 μg/ml アンピシリンを含有する TYE プレート上にプレートする。次いで、得られる細菌ライブラリーを、上記のように 遺伝子 3 ヘルパーファージでレスキューし、次の回の選択のためのファージを調製する。次いで、このプロセスを、アフィニティー精製の全 4 回について反復し、3 回目および 4 回目については、チューブ洗浄を PBS、0.1% Tween - 20 で 20 回、および PBS で 20 回に増加する。

【0540】

(結合剤の特徴付け)

第 3 回目および 4 回目の選択から溶出したファージを用いて、E. coli HB 2151 を感染させ、そして可溶性 scFv をアッセイのために単一口コーンから生成する (Marks ら、1991)。50 mM 炭酸水素塩、pH 9.6 中の本発明のポリペプチドの 10 pg/ml のいずれかで被覆したマイクロタ

イタープレートを用いてELISAを実行する。ELISA中の陽性クローンをPCRフィンガープリンティング(例えば、WO92/01047を参照のこと)、次に配列決定することによりさらに特徴付ける。

【0541】

(実施例9：ニューロン活性を同定するスクリーニングアッセイ)

細胞が分化および増殖を経験する場合、一群の遺伝子が、多くの異なるシグナル伝達経路を介して活性化される。これらの遺伝子のうちの1つであるEGR1(初期増殖応答遺伝子1)は、種々の組織および細胞型において活性化の際に誘導される。EGR1のプロモーターは、このような誘導を担う。レポーター分子に連結されたEGR1プロモーターを使用して、細胞の活性化をスタニオカルシンにより評価し得る。

【0542】

特に、以下のプロトコルを使用して、PC12細胞株におけるニューロン活性を評価する。PC12細胞(ラット褐色細胞腫(phenochromocytoma)細胞)は、多数のマイトジェン(例えば、TPA(テトラデカノイルホルボルアセテート)、NGF(神経成長因子)、およびEGF(上皮増殖因子)による活性化により増殖および/または分化することが公知である。EGR1遺伝子発現が、この処理の間に活性化される。従って、SEAPレポーターに連結したEGRプロモーターを含む構築物でPC12細胞を安定にトランスフェクトすることにより、スタニオカルシンによるPC12細胞の活性化を評価し得る。

【0543】

EGR/SEAPレポーター構築物を、以下のプロトコルにより構築し得る。EGR-1プロモーター配列(-633~+1)(Sakamoto Kら、Oncogene 6:867~871(1991))を、以下のプライマーを使用して、ヒトゲノムDNAからPCR増幅し得る：

【0544】

【化4】

5' GCGCTCGAGGGATGACAGCGATAGAACCCCGG -3' (配列番号
:11)
5' GCGAAGCTTCGCGACTCCCCGGATCCGCCTC-3'

(配列番号12)。

【0545】

実施例13にて作製したGAS:SEAP/Neoベクターを使用して、その後、EGR1増幅産物をこのベクター中に挿入し得る。GAS:SEAP/Neoベクターを制限酵素XhoI/HindIIIを使用して線状化し、GAS/SV40スタッファーを除去する。これらの同じ酵素を用いてEGR1増幅産物を制限処理する。ベクターとEGR1プロモーターとを連結する。

【0546】

細胞培養のための96ウェルプレートを調製するために、2mlのコーティング溶液(30%エタノール中のコラーゲンI型(Upstate Biotech Inc. カタログ番号08-115)の1:30希釈液(フィルター滅菌済み))を1つの10cmプレートに添加するか、または96ウェルプレートの1ウェルあたり50mlを添加し、そして2時間風乾させる。

【0547】

PC12細胞を、事前コーティングした10cm組織培養皿上で100単位/mlペニシリンおよび100µg/mlストレプトマイシンを補充した、10%ウマ血清(JRH BIOSCIENCES、カタログ番号12449-78P)、5%熱非働化ウシ胎仔血清(FBS)を含むRPMI-1640培地(Bio Whittaker)にて慣用的に増殖させる。3~4日ごとに1つから4つへの分割を行なう。細胞を、掻き取ることによりプレートから取り出し、そして15回より多くピペッティングで上下することにより再懸濁する。

【0548】

実施例12に記載されるリポフェクタミンプロトコルを使用してPC12にEGR/SEAP/Neo構築物をトランスフェクトする。安定なEGR-SEA

P / P C 1 2 細胞を、3 0 0 μ g / m l G 4 1 8 において細胞を増殖させることによって得る。G 4 1 8 を含まない培地を慣用的増殖に使用するが、1 ~ 2 ヶ月ごとに、細胞を、数回の継代の間、3 0 0 μ g / m l G 4 1 8 にて再増殖させるべきである。

【0549】

ニューロン活性についてアッセイするために、約70 ~ 80%コンフルエントの細胞を含む10cmプレートを、古い培地を除去することによりスクリーニングする。細胞をPBS(リン酸緩衝化生理食塩水)で一度洗浄する。次いで、低血清培地(1%ウマ血清および0.5%FBSを抗生物質とともに含むRPMI-1640)中で細胞を一晩飢餓にする。

【0550】

翌朝、培地を除去し、そして細胞をPBSで洗浄する。プレートから細胞を掻き取り、細胞を2ml低血清培地中に十分懸濁する。細胞数を計数し、そしてより低血清の培地を添加して、最終細胞密度を 5×10^5 細胞/mlとして達成する。

【0551】

96ウェルプレートの各ウェルに細胞懸濁液200 μ lを添加する(1×10^5 細胞/ウェルと等価)。実施例12により作製される上清を50 μ l、37で48 ~ 72時間添加する。ポジティブコントロールとして、EGRを介してPC12細胞を活性化することが公知の増殖因子(例えば、神経成長因子(NGF)50ng/ μ l)を使用し得る。SEAPの50倍を超える誘導が、代表的に、ポジティブコントロールウェルにおいて観察される。実施例5に従う上清をSEAPアッセイする。

【0552】

(実施例10:低分子の濃度および膜透過性における変化を同定するスクリーニングアッセイ)

レセプターへのリガンドの結合は、カルシウム、カリウム、ナトリウムのような低分子およびpHの細胞内レベルを変化させ、ならびに膜電位を変化させることは公知である。これらの変化を、特定細胞のレセプターに結合する上清を同定

するためのアッセイで測定し得る。以下のプロトコルは、カルシウムについてのアッセイを記載するが、このプロトコルは、カリウム、ナトリウム、pH、膜電位、または蛍光プローブにより検出可能な任意の他の低分子における変化を検出するように容易に改変し得る。

【0553】

以下のアッセイは、蛍光測定画像化プレートリーダー（「FLIPR」）を使用して低分子と結合する蛍光分子（Molecular Probes）における変化を測定する。明らかに、低分子を検出する任意の蛍光分子を本明細書で用いるカルシウム蛍光分子、fluo-3の代わりに使用し得る。

【0554】

接着細胞については、細胞を10,000~20,000細胞/ウェルで、底が透明なCo-star黒色96ウェルプレートに播種する。プレートをCO₂インキュベーター内で20時間インキュベートする。接着細胞をBiotek洗浄器内で200μlのHBSS（ハクス平衡化塩溶液）で二回洗浄し、最後の洗浄後、緩衝液100μlを残す。

【0555】

1mg/mlのfluo-3のストック溶液を10%プルロン酸（pluronic acid）DMSOにて作製する。細胞にfluo-3を負荷するため、12μg/mlのfluo-3（50μl）を各ウェルに添加する。このプレートをCO₂インキュベーター中、37℃で60分間インキュベートする。プレートをBiotek洗浄器において、HBSSで4回洗浄し、緩衝液100μlを残す。

【0556】

非接着細胞については、細胞を培養培地からスピンドウンする。細胞を、50mlのコニカルチューブ内でHBSSを用いて2~5×10⁶細胞/mlに再懸濁する。細胞懸濁液1mlあたり、10%プルロン酸DMSO中1mg/mlのfluo-3溶液4μlを加える。次に、チューブを37℃の水浴中に30~60分間置く。細胞をHBSSで二回洗浄し、1×10⁶細胞/mlに再懸濁し、そしてマイクロプレートに100μl/ウェルずつ分配する。プレートを100

0 rpmで5分間遠心分離する。次に、プレートをDenley Cell Wash中で200 µlで一回洗浄した後、吸引工程により最終容量を100 µlにする。

【0557】

非細胞ベースのアッセイについては、各ウェルは、fluo-3のような蛍光分子を含有する。上清をウェルに添加し、そして蛍光変化を検出する。

【0558】

細胞内カルシウムの蛍光を測定するため、FLIPRを以下のパラメーターについて設定する：(1)システムゲインは、300~800 mWであり；(2)露光時間は、0.4秒間であり；(3)カメラF/ストップは、F/2であり；(4)励起は488 nmであり；(5)発光は530 nmであり；そして(6)サンプル添加は50 µlである。530 nmにおける発光の増加は、スタニオカルシンまたはスタニオカルシンによって誘導される分子のいずれかである分子によって引き起こされる、細胞外シグナル伝達事象を示し、これは細胞内Ca⁺⁺濃度の増加を生じた。

【0559】

(実施例11：SEAP活性についてのアッセイ)

実施例14~17に記載されるアッセイについてのレポーター分子として、SEAP活性を、Tropix Phospho-light Kit (Cat. BP-400)を使用してアッセイする。以下の一般的手順に従ってTropix Phospho-light Kitは、以下で使用する希釈緩衝液、アッセイ緩衝液および反応緩衝液を供給する。

【0560】

2.5 x 希釈緩衝液をディスペンサーに詰め、そして2.5 x 希釈緩衝液15 µlを、35 µlの上清を含むOptiplateに分配する。プレートをプラスチックシーラーでシールし、そして65 °Cで30分間インキュベートする。これらのOptiplateを分離して、一様でない加熱を避ける。

【0561】

サンプルを室温まで15分間冷ます。ディスペンサーを空にし、そしてアッセ

イ緩衝液を詰める。50mlアッセイ緩衝液を添加し、そして室温で5分間インキュベートする。ディスペンサーを空にし、そして反応緩衝液(下記表を参照のこと)を詰める。50ml反応緩衝液を添加し、そして室温で20分間インキュベートする。化学発光シグナルの強度は時間依存性であり、そしてルミノメーターで5つのプレートを読み取るのに約10分間かかるので、各回で5つのプレートを処理しそして10分後に第2のセットを開始すべきである。

【0562】

ルミノメーターにて相対光単位を読み取る。H12をブランクとしてセットし、そして結果をプリントする。化学発光の増加が、レポーター活性を示す。

【0563】

(反応緩衝液の処方)

【0564】

【表2】

プレート数	反応液平衡液希釈物(ml)	CSPD (ml)
10	60	3
11	65	3.25
12	70	3.5
13	75	3.75
14	80	4
15	85	4.25
16	90	4.5
17	95	4.75
18	100	5
19	105	5.25
20	110	5.5
21	115	5.75
22	120	6
23	125	6.25
24	130	6.5
25	135	6.75
26	140	7
27	145	7.25
28	150	7.5
29	155	7.75
30	160	8
31	165	8.25
32	170	8.5
33	175	8.75
34	180	9
35	185	9.25
36	190	9.5
37	195	9.75
38	200	10
39	205	10.25
40	210	10.5
41	215	10.75
42	220	11

(つぎ)		
43	225	11.25
44	230	11.5
45	235	11.75
46	240	12
47	245	12.25
48	250	12.5
49	255	12.75
50	260	13

(実施例12：生物学的サンプル中のスタニオカルシンの異常レベルを検出する方法)

スタニオカルシンポリペプチドを生物学的サンプル中で検出し得、そしてスタニオカルシンレベルの上昇または低下が検出される場合、このポリペプチドは、特定表現型のマーカーである。検出方法は多数であり、そしてそれ故、当業者は以下のアッセイをそれらの特定の必要性に適合するように改変し得ることが理解される。

【0565】

例えば、抗体サンドイッチELISAを使用し、サンプル中、好ましくは、生物学的サンプル中の、スタニオカルシンを検出する。マイクロタイタープレートのウェルを、スタニオカルシンに対する特異的抗体を最終濃度0.2~10 μ g/mlで用いてコーティングする。この抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであって、実施例11に記載の方法により産生される。ウェルに対するスタニオカルシンの非特異的結合が減少するように、このウェルをブロックする。

【0566】

次に、コーティングしたウェルを、スタニオカルシン含有サンプルを用いて室温で2時間を超えてインキュベートする。好ましくは、サンプルの系列希釈を使用して結果を確認すべきである。次に、プレートを脱イオン水または蒸留水で三回洗浄し、非結合スタニオカルシンを除去する。

【0567】

次に、特異的抗体 - アルカリホスファターゼ結合体 $50 \mu\text{l}$ を $25 \sim 400 \text{ ng}$ の濃度で加え、室温で2時間インキュベートする。プレートを再び脱イオン水または蒸留水で三回洗浄し、未結合の結合体を除去する。

【0568】

4 - メチルウンベリフェリルリン酸 (MUP) または p - ニトロフェニルリン酸 (NPP) 基質溶液 $75 \mu\text{l}$ を各ウェルに添加し、そして室温で1時間インキュベートする。反応物をマイクロタイタープレートリーダーにより測定する。コントロールサンプルの系列希釈を使用して標準曲線を作成し、そしてX軸 (対数スケール) にスタニオカルシンポリペプチド濃度を、そしてY軸 (線形スケール) に蛍光または吸光度をプロットする。標準曲線を用いてサンプル中のスタニオカルシン濃度を補間する。

【0569】

(実施例13: ポリペプチドの処方)

スタニオカルシン組成物を、個々の患者の臨床状態 (特に、スタニオカルシンポリペプチド単独処置の副作用)、送達部位、投与方法、投与計画および当業者に公知の他の因子を考慮に入れ、医療実施基準 (good medical practice) を遵守する方式で処方および投薬する。従って、本明細書において目的とする「有効量」は、このような考慮を行って決定される。

【0570】

一般的提案として、用量当り、非経口的に投与されるスタニオカルシンの合計薬学的有効量は、患者体重の、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日} \sim 10 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ の範囲にあるが、上記のようにこれは治療上の裁量に委ねられる。さらに好ましくは、このホルモンについて、この用量は、少なくとも $0.01 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、最も好ましくはヒトに対して約 $0.01 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ と約 $1 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ との間である。連続投与する場合、代表的には、スタニオカルシンを約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{時間} \sim 約 50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{時間}$ の投薬速度で1日に1～4回の注射かまたは連続皮下注入 (例えばミニポンプを用いる) のいずれかにより投与する。静脈内用バッグ溶液もまた使用し得る。変化を観察するために必要な処置の長さおよび応答

が生じる処置後の間隔は、所望の効果に応じて変化するようである。

【0571】

スタニオカルシンを含む薬学的組成物を、経口投与、直腸内投与、非経口投与、槽内 (intracisternally) 投与、腔内投与、腹腔内投与、局所的投与 (散剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど)、頬内投与し得るか、あるいは経口スプレーまたは鼻腔スプレーとして投与し得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の製剤補助剤をいう。本明細書で用いる用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【0572】

スタニオカルシンはまた、徐放性系により適切に投与される。徐放性組成物の適切な例としては、成形品 (例えば、フィルムまたはマイクロカプセル) の形態の半透過性ポリマーマトリックス) が挙げられる。徐放性マトリックスとしては、ポリラクチド (米国特許第3,773,919号、EP58,481)、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタメートとのコポリマー (Sidman, U.S. Pat. 4,255,547 (1979); Sidman et al., Biopolymers 22:547-556 (1983))、ポリ (2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (R. Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981))、および R. Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982))、エチレンビニルアセテート (R. Langer et al.) またはポリ-D-(α)-3-ヒドロキシ酪酸 (EP133,988) が挙げられる。徐放性組成物はまた、リポソームに包括されたスタニオカルシンポリペプチドを包含する。スタニオカルシンを含有するリポソームは、それ自体が公知である方法により調製され得る: DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980); EP52,322; EP36,676; EP88,046; EP143,949; EP142,641; 日本国特許出願第83-118008号; 米国特許

第4, 485, 045号および同第4, 544, 545号ならびにEP第102, 324号。通常、リポソームは、小さな(約200~800)単層型であり、そこでは、脂質含有量は、約30モル%コレステロールよりも多く、選択された割合が、最適な分泌ポリペプチド治療のために調整される。

【0573】

非経口投与のために、1つの実施形態において、一般には、スタニオカルシンは、それを所望の程度の純度で、薬学的に受容可能なキャリア(すなわち、用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、かつ処方物の他の成分と適合するもの)と、単位投薬量の注射可能な形態(溶液、懸濁液または乳濁液)でスタニオカルシンを混合することにより処方される。例えば、この処方物は、好ましくは、酸化剤、およびポリペプチドに対して有害であることが知られている他の化合物を含まない。

【0574】

一般に、スタニオカルシンを液体キャリアまたは微細分割固体キャリアあるいはその両方と均一および緊密に接触させて、処方物を調製する。次に、必要であれば、生成物を所望の処方物に成形する。好ましくは、キャリアは、非経口的キャリア、より好ましくはレシピエントの血液と等張である溶液である。このようなキャリアビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液およびデキストロース溶液が挙げられる。不揮発性油およびオレイン酸エチルのような非水性ビヒクルもまた、リポソームと同様に本明細書において有用である。

【0575】

このキャリアは、等張性および化学安定性を高める物質のような微量の添加剤を適切に含有する。このような物質は、用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、このような物質としては、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸および他の有機酸またはその塩類のような、緩衝剤；アスコルビン酸のような抗酸化剤；低分子量(約10残基より少ない)ポリペプチド(例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド)；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのような、タンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのような、アミノ

酸；セルロースまたはその誘導体、グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の糖質；EDTAのようなキレート剤；マンニトールまたはソルビトールのような、糖アルコール；ナトリウムのような対イオン；および/またはポリソルベート、ポロキサマーもしくはPEGのような、非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0576】

スタニオカルシンは、代表的には約0.1mg/ml~100mg/ml、好ましくは1~10mg/mlの濃度で、約3~8のpHで、このようなビヒクル中に処方される。上記の特定の賦形剤、キャリアまたは安定化剤を使用することにより、ポリペプチド塩が形成されることが理解される。

【0577】

治療的投与に用いられる任意のスタニオカルシンは滅菌状態であり得る。滅菌濾過膜（例えば0.2ミクロンメンブレン）を通す濾過により、滅菌状態を容易に達成する。一般に、治療ポリペプチド組成物を、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下用注射針で穿刺可能なストッパー付の静脈内用溶液バッグまたはバイアルに配置する。

【0578】

スタニオカルシンポリペプチドは、通常、単位用量容器または複数用量容器、例えば、密封アンプルまたはバイアルに、水溶液または再構成するための凍結乾燥処方物として貯蔵する。凍結乾燥処方物の例として、10mlのバイアルに、滅菌濾過した1%（w/v）スタニオカルシンポリペプチド水溶液5mlを充填し、そして得られる混合物を凍結乾燥する。凍結乾燥したポリペプチドを、注射用静菌水を用いて再構成して、注入溶液を調製する。

【0579】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の成分の1つ以上を充填した一つ以上の容器を備える、薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。さらに、スタニオカルシンを他の治療用化合

物と組み合わせて使用し得る。

【0580】

本発明の組成物は、単独で、または他の治療剤と組み合わせて投与し得る。本発明の組成物とともに投与し得る治療剤としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：低酸素症、虚血、発作または心臓発作に付随する組織損傷を処置もしくは予防する際に有用な他の組成物、および/またはTNFファミリーのメンバー、化学療法剤、抗生物質、ステロイド性および非ステロイド性の抗炎症剤、従来の免疫療法剤、サイトカインならびに/または増殖因子。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで、投与し得る。これは、組み合わせられた薬剤を治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤を別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じての場合）投与する手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に与えられ、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

【0581】

好ましい実施形態において、本発明の組成物は、低酸素症、虚血、梗塞形成、発作および/または心臓発作に関連する、細胞または組織の損傷を処置または予防する際に有用な他の化合物と組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る化合物としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：TPA（例えば、米国特許第5,714,145号を参照のこと（これは、本明細書中に参考として援用される））；チクロピジン（例えば、米国特許第5,945,432号を参照のこと（これは、本明細書中に参考として援用される））；クロピドグレルビスルフェート（例えば、米国特許第5,576,328号を参照のこと（これは、本明細書中に参考として援用される））；代謝生成物産生性グルタミン酸レセプターアゴニスト（例えば、L(+)-2-アミノ-4ホスホノ酪酸、トランス-アミノシクロペンタンジカルボン酸、(1S,3R)-アミノシクロペンタンジカルボン酸、または例えばその四級酸）（米国特許第5,500,420号を参照のこと（これは、その全体が本明細書中に参考として援用される））；米国特許第5,519,035号に開示される群より選択される

プロテインキナーゼCインヒビター（米国特許第5,519,035号を参照のこと（これは、その全体が本明細書中に参考として援用される））；米国特許第5,888,996に開示される群より選択されるNMDAグルタミン酸レセプターインヒビター（米国特許第5,888,996号を参照のこと（これは、その全体が本明細書中に参考として援用される））；米国特許第5,844,003に開示される群より選択されるデプレニール、またはその誘導体（米国特許第5,844,003号を参照のこと（これは、その全体が本明細書中に参考として援用される））；バルビツール酸（米国特許第5,474,990号を参照のこと（これは、その全体が本明細書中に参考として援用される））；およびS-()-N-プロパルギル-1-アミノインダン（国際公開番号WO98/02152号を参照のこと（これは、その全体が本明細書中に参考として援用される））。

【0582】

1つの実施形態において、本発明の組成物は、TNFファミリーの他のメンバーと組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得るTNF分子、TNF関連分子、またはTNF様分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：可溶性形態のTNF- α 、リンホトキシン- α 、（LT- α 、TNF- α としても公知）、LT- β （複合ヘテロトリマーLT- β の状態で見出された）、OPGL、FasL、CD27L、CD30L、CD40L、4-1BBL、DcR3、OX40L、TNF- β （国際公開番号WO96/14328）、AIM-I（国際公開番号WO97/33899）、エンドカイン（endokine）- β （国際公開番号WO98/07880）、TR6（国際公開番号WO98/30694）、OPG、およびニュートロカイン（neutrokine）- α （国際公開番号WO98/18921）、OX40、および神経成長因子（NGF）、ならびに可溶性形態のFas、可溶性形態のCD30、可溶性形態のCD27、可溶性形態のCD40および可溶性形態の4-1BB、TR2（国際公開番号WO96/34095）、DR3（国際公開番号WO97/33904）、DR4（国際公開番号WO98/32856）、TR5（国際公開番号WO98/30693）、TR6（国際公開番号WO98/30

694)、TR7(国際公開番号WO98/41629)、TRANK、TR9(国際公開番号WO98/56892)、TR10(国際公開番号WO98/54202)、312C2(国際公開番号WO98/06842)、およびTR12、ならびに可溶性形態のCD154、可溶性形態のCD70、および可溶性形態のCD153。

【0583】

本発明の組成物とともに投与され得る従来の非特異的免疫抑制剤としては、ステロイド類、シクロスポリン、シクロスポリンアナログ、シクロホスファミドメチルプレドニゾン、プレドニゾン、アザチオプリン、FK-506、15-デオキシスペルグアリン(15-deoxyspergualin)、および応答T細胞の機能を抑制することによって作用する他の免疫抑制剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0584】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、抗生物質と組合せて投与される。本発明の組成物と共に投与され得る抗生物質としては、テトラサイクリン、メトロニダゾール、アンモキシシリン、ラクタマーゼ、アミノグリコシド、マクロライド、キノロン、フルオロキノロン、セファロスポリン、エチロマイシン、シプロフロキサシン、およびストレプトマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0585】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、単独でかまたは抗炎症剤と組み合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る抗炎症剤としては、グルココルチコイドおよび非ステロイド抗炎症剤、アミノアリアルカルボン酸誘導体、アリアル酢酸誘導体、アリアル酪酸誘導体、アリアルカルボン酸、アリアルプロピオン酸誘導体、ピラゾール類、ピラゾロン類、サリチル酸誘導体、チアジンカルボキサミド類、e-アセトアミドカプロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン(amixetrine)、ベンダザック、ベンジダミン、ブコローム、ジフェンピラミド、ジタゾール、エモルファゾン、グアイアズレン、ナブメトン、ニメスリド、オルゴテイン

、オキサセプロール、パラニリン (paranyline)、ペリソキサール、ピフオキシム、プロカゾン、プロキサゾール、およびテニダブが挙げられるが、これらに限定されない。

【0586】

別の実施形態において、本発明の組成物は、化学療法剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る化学療法剤としては、抗生物質誘導体 (例えば、ドキシソルビシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、およびダクチノマイシン) ; 抗エストロゲン (例えば、タモキシフェン) ; 抗代謝物 (例えば、フルオロウラシル、5-FU、メトトレキサート、フロクスウリジン、インターフェロン - 2b、グルタミン酸、プリカマイシン (plicamycin)、メルカプトプリン、および6-チオグアニン) ; 細胞傷害剤 (例えば、カルムスチン、BCNU、ロムスチン、CCNU、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エストラムスチン、ヒドロキシウレア、プロカルバジン、マイトマイシン、ブスルファン、シス-プラチン、および硫酸ビンクリスチン) ; ホルモン (例えば、メドロキシプロゲステロン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エチニルエストラジオール、エストラジオール、酢酸メゲストロール、メチルテストステロン、ジエチルスチルベストロールジホスフェート、クロロトリアニセン、およびテストラクトン) ; ナイトロジェンマスタード誘導体 (例えば、メファレン (mephalen)、クロランブシル (chlorambucil)、メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード) およびチオテパ) ; ステロイド類および組み合わせ (例えば、ベタメタゾンリン酸ナトリウム) ; ならびにその他 (例えば、ジカルバジン (dicarbazine)、アスパラギナーゼ、ミトートテン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、およびエトポシド) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0587】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、サイトカインと組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得るサイトカインとしては、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL10、IL12、IL13、IL15、抗CD40、CD40L、IFN- およびTNF- が挙げられ

るが、これらに限定されない。

【0588】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、脈管形成タンパク質と組合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る脈管形成タンパク質としては、欧州特許EP-399816に開示されるようなグリオーム誘導増殖因子(Glioma Derived Growth Factor)(GDGF)；欧州特許EP-682110に開示されるような血小板誘導増殖因子-A(PDGF-A)；欧州特許EP-282317に開示されるような血小板誘導増殖因子-B(PDGF-B)；国際公開番号WO92/06194号に開示されるような胎盤増殖因子(PIGF)；Hauserら、Growth Factors、4:259-268(1993)に開示されるような胎盤増殖因子-2(PIGF-2)；国際公開番号WO90/13649号に開示されるような血管内皮増殖因子(VEGF)；欧州特許EP-506477に開示されるような血管内皮増殖因子-A(VEGF-A)；国際公開番号WO96/39515号に開示されるような血管内皮増殖因子-2(VEGF-2)；国際公開番号WO96/26736号に開示されるような血管内皮増殖因子B-186(VEGF-B186)；国際公開番号WO98/02543号に開示されるような血管内皮増殖因子-D(VEGF-D)；国際公開番号WO98/07832号に開示されるような血管内皮増殖因子-D(VEGF-D)；およびドイツ国特許DE19639601に開示されるような血管内皮増殖因子-E(VEGF-E)が挙げられるが、これらに限定されない。上記の参考文献は、本明細書で参考として援用される。

【0589】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、線維芽細胞増殖因子と組合わせて投与される。本発明の組成物とともに投与され得る線維芽細胞増殖因子としては、FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、およびFGF-15が挙げられるが、これらに限定されない。

【0590】

さらなる実施形態において、本発明の組成物は、他の治療レジメまたは予防レジメ（例えば、放射線治療）と組合わせて投与される。

【0591】

（実施例14：スタニオカルシンのレベル低下を処置する方法）

本発明は、体内におけるスタニオカルシンのレベルを低下させる必要のある個体を処置するための方法に関し、その方法は、治療有効量のスタニオカルシンのアンタゴニストを含む組成物をそのような個体に投与する工程を包含する。本発明において使用するための好ましいアンタゴニストは、スタニオカルシン特異的抗体である。

【0592】

さらに、個体におけるスタニオカルシンの標準または正常発現レベルの低下により引き起こされる状態は、スタニオカルシンを、好ましくは分泌形態で投与することにより処置し得ることが理解される。従って、本発明はまた、スタニオカルシンポリペプチドのレベルの増加が必要な個体の処置方法を提供する。この方法は、このような個体に、このような個体でスタニオカルシンの活性レベルを増加させる量のスタニオカルシンを含む薬学的組成物を投与する工程を包含する。

【0593】

例えば、スタニオカルシンポリペプチドのレベルが低下した患者は、ポリペプチドを、1日用量0.1～100 μ g/kgで6日続けて服用する。好ましくは、ポリペプチドは分泌形態である。投与および処方物に基づく投薬計画の正確な詳細は、実施例24に提供されている。

【0594】

（実施例15：スタニオカルシンのレベル上昇を処置する方法）

本発明はまた、体内におけるスタニオカルシン活性のレベルを上昇させる必要のある個体を処置するための方法に関し、その方法は、治療有効量のスタニオカルシンまたはそのアゴニストを含む組成物をそのような個体に投与する工程を包含する。

【0595】

アンチセンス技術を使用してスタニオカルシンの産生を阻害する。この技術は、癌のような様々な病因に起因するスタニオカルシンポリペプチド、好ましくは分泌形態のスタニオカルシンのレベルを低下させる方法の1つの例である。

【0596】

例えば、スタニオカルシンのレベルが異常に上昇したと診断された患者に、アンチセンスポリヌクレオチドを、0.5、1.0、1.5、2.0および3.0 mg/kg/日で静脈内に21日間投与する。この処置に対して十分な耐性があれば、7日間の休薬期間後に、この処置を繰り返す。アンチセンスポリヌクレオチドの処方は、実施例24に提供されている。

【0597】

(実施例16：遺伝子治療を使用する処置方法 - エキソビボ)

遺伝子治療の1つの方法は、スタニオカルシンポリペプチドを発現し得る線維芽細胞を患者に移植する方法である。一般に、線維芽細胞は、皮膚生検により被験者から得られる。得られた組織を組織培養培地中に配置し、小片に分割する。小塊の組織を組織培養フラスコの湿潤表面に置き、ほぼ10片を各フラスコに置く。このフラスコを倒置し、しっかりと閉めた後、室温で一晩放置する。室温で24時間後、フラスコを反転させ、組織塊をフラスコの底に固定させたままにし、そして新鮮培地(例えば、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するHamのF12培地)を添加する。次に、フラスコを37°Cで約1週間インキュベートする。

【0598】

この時点で、新鮮培地を添加し、次いで数日ごとに取り換える。さらに二週間培養した後に単層の線維芽細胞が出現する。単層をトリプシン処理し、さらに大きなフラスコにスケールアップする。

【0599】

Moloney マウス肉腫ウイルスの長末端反復が隣接する pMV-7 (Kirschmeier, P. T. ら、DNA, 7:219-25 (1988)) を EcoRI および HindIII で消化した後、仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。線状ベクターをアガロースゲルで分画し、そしてガラスビーズを使用して

精製する。

【0600】

スタニオカルシンをコードするcDNAを、実施例1に記載のそれぞれ5'および3'末端配列に対応するPCRプライマーを使用して増幅し得る。好ましくは、5'プライマーはEcoRI部位を含み、そして3'プライマーはHindIII部位を含む。等量の、Moloneyマウス肉腫ウイルス線状骨格および増幅したEcoRIおよびHindIIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を二つのフラグメントを連結するのに適した条件下で維持する。次に、連結混合物を使用し、細菌HB101を形質転換する。次に、それを、カナマイシンを含む寒天上にプレーティングし、ベクターが正確に挿入された目的の遺伝子を有することを確認する。

【0601】

アンフトロピックpA317またはGP+am12パッケージング細胞を、10%仔ウシ血清(CS)、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むDulbecco改変Eagles培地(DMEM)中、組織培養でコンフルエントな密度まで増殖させる。次に、スタニオカルシンをコードする遺伝子を含むMSVベクターを培地に加え、そしてパッケージング細胞にベクターを形質導入する。このとき、パッケージング細胞はスタニオカルシン遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する(ここで、パッケージング細胞をプロデューサー細胞という)。

【0602】

形質導入されたプロデューサー細胞に新鮮培地を添加し、次いで培地を10cmプレートのコンフルエントなプロデューサー細胞から採取する。感染性ウイルス粒子を含む使用済み培地を、ミリポアーフィルターを通して濾過し、はがれたプロデューサー細胞を除去した後、この培地を使用して、線維芽細胞を感染させる。線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから培地を除去し、そしてプロデューサー細胞からの培地で速やかに置き換える。この培地を除去し、そして新鮮培地と置き換える。ウイルスの力価が高ければ、実質的にすべての線維芽細胞が感染され、選択は必要ではない。力価が非常に低ければ、neoまたはhisのような選択マーカーを有するレトロウイルスベクターを使用することが必要で

ある。一旦、線維芽細胞が効率的に感染したなら、線維芽細胞を分析し、スタニオカルシタンパク質が産生されているか否かを決定する。

【0603】

次に、操作された線維芽細胞を、単独で、またはサイトデックス3マイクロキヤリアピース上でコンフルエントに増殖させた後のいずれかで宿主に移植する。

【0604】

(実施例17：内因性スタニオカルシン遺伝子を使用する遺伝子治療)

本発明に従う遺伝子治療の別の方法は、内因性スタニオカルシン配列を、例えば、米国特許第5,641,670号(1997年6月24日出願)；国際公開第WO 96/29411号(1996年9月26日公開)；国際公開第WO 94/12650号(1994年8月4日公開)；Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932~8935(1989)；およびZijlstraら、Nature, 342:435~438(1989)に記載されるように、相同組換えを介してプロモーターに作動可能に結合する工程を包含する。この方法は、その標的細胞中に存在するが、その細胞中で発現されないかまたは所望されるよりも低いレベルで発現される、遺伝子の活性化を包含する。

【0605】

プロモーターおよび標的化配列を含むポリヌクレオチド構築物を作製する。この標的配列は、プロモーターに隣接する、内因性スタニオカルシンの5'非コード配列と相同である。この標的配列は、スタニオカルシンの5'末端に十分に近く、その結果、このプロモーターは、相同組換えの際にこの内因性配列に作動可能に連結される。このプロモーターおよび標的化配列を、PCRを使用して増幅し得る。好ましくは、この増幅したプロモーターは、5'末端および3'末端上に異なる制限酵素部位を含む。好ましくは、第1の標的化配列の3'末端は、増幅したプロモーターの5'末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第2の標的化配列の5'末端は、増幅したプロモーターの3'末端と同じ制限酵素部位を含む。

【0606】

この増幅したプロモーターおよび増幅した標的化配列を、適切な制限酵素で消化し、続いてウシ腸ホスファターゼで処理する。消化したプロモーターおよび消化した標的化配列を、T4 DNAリガーゼの存在下でともに加える。生じた混合物を、これら2つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。この構築物をアガロースゲル上でサイズ分画し、次いでフェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製する。

【0607】

この実施例において、このポリヌクレオチド構築物を、エレクトロポレーションを介して裸のポリヌクレオチドとして投与する。しかし、このポリヌクレオチド構築物はまた、トランスフェクション促進剤（例えば、リポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、沈殿剤など）とともに投与し得る。送達のためのこのような方法は、当該分野で公知である。

【0608】

一旦、細胞をトランスフェクトすると、相同組換えが生じて、この内因性スタニオカルシン配列に作動可能に連結されるプロモーターを生じる。これは、この細胞中におけるスタニオカルシン発現を生じる。発現は、免疫学的染色または当該分野で公知の他の任意の方法により、検出され得る。

【0609】

線維芽細胞を、皮膚生検により被験者から得る。得られた組織を、DMEM + 10%胎仔ウシ血清中に配置する。対数増殖期または定常期初期の線維芽細胞を、トリプシン処理し、そしてプラスチックの表面から栄養培地でリンスする。細胞懸濁液のアリコートをし、計数のために取り出し、そして残りの細胞を遠心分離に供する。上清を吸引し、そしてペレットを5mlのエレクトロポレーション緩衝液（20mM HEPES pH7.3、137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM Na₂HPO₄、6mMデキストロース）に再懸濁する。この細胞を再遠心分離し、上清を吸引し、そして細胞をアセチル化ウシ血清アルブミン1mg/mlを含むエレクトロポレーション緩衝液に再懸濁する。この最終細胞懸濁物は、約3 × 10⁶細胞/mlを含む。エレクトロポレーションを、再懸濁直後に実施すべきである。

【0610】

プラスミドDNAを、標準的技術に従って調製する。例えば、スタニオカルシン遺伝子座に標的化するためのプラスミドを構築するために、プラスミドpUC18(MBI Fermentas, Amherst, NY)をHindIIIで消化する。CMVプロモーターを、5'末端にXbaI部位および3'末端にBamHI部位を備えてPCRにより増幅する。2つのスタニオカルシン非コード配列をPCRを介して増幅する：一方のスタニオカルシン非コード配列(スタニオカルシンフラグメント1)を、5'末端にHindIII部位および3'末端にXbaI部位を備えて増幅する；他方のスタニオカルシン非コード配列(スタニオカルシンフラグメント2)を、5'末端にBamHI部位および3'末端にHindIII部位を備えて増幅する。このCMVプロモーターおよびスタニオカルシンフラグメントを、適切な酵素(CMVプロモーター-XbaIおよびBamHI；スタニオカルシンフラグメント1-XbaI；スタニオカルシンフラグメント2-BamHI)で消化し、そしてともに連結する。生じた連結生成物をHindIIIで消化し、そしてHindIIIで消化したpUC18プラスミドと連結する。

【0611】

プラスミドDNAを、0.4cmの電極ギャップを備える滅菌キュベット(Bio-Rad)に添加する。最終DNA濃度は、一般的に、少なくとも120 μ g/mlである。次いで、この細胞懸濁液の0.5ml(約 1.5×10^6 細胞を含む)をこのキュベットに添加し、そしてこの細胞懸濁液およびDNA溶液を、穏やかに混合する。エレクトロポレーションを、Gene-Pulser装置(Bio-Rad)を用いて実施する。キャパシタンスおよび電圧を、それぞれ、960 μ Fおよび250~300Vに設定する。電圧が増加すると、細胞の生存が減少するが、導入されたDNAをそのゲノム中に安定に組込む生存細胞の割合が劇的に増加する。これらのパラメーターを与えると、パルス時間約14~20mSecが観察されるはずである。

【0612】

エレクトロポレーションした細胞を、室温で約5分間維持し、次いで、このキ

キュベットの中身を、滅菌した移動ピペットを用いて穏やかに取り出す。この細胞を、10cmのディッシュ中の、予め温めた栄養培地(15%ウシ血清を含むDMEM)10mlに直接加え、そして37℃でインキュベートする。翌日、この培地を吸引し、そして10mlの新鮮な培地で置換し、そしてさらに16~24時間インキュベートする。

【0613】

次いで、操作された線維芽細胞を、宿主中に、単独か、またはサイトデックス(cytodex)3マイクロキャリア(microcarrier)ビーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後かのいずれかで、注入する。ここで、この線維芽細胞は、タンパク質産物を生成する。次いで、この線維芽細胞を、上記のような患者に導入し得る。

【0614】

(実施例18：遺伝子治療を使用する処置方法 - インビボ)

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するためにインビボ遺伝子治療方法を使用することである。この遺伝子治療法は、スタニオカルシンポリペプチドの発現を増大または減少させるための、動物への裸の核酸(DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA)スタニオカルシン配列の導入に関する。スタニオカルシンポリペプチドは、プロモーター、または標的組織によるスタニオカルシンポリペプチドの発現に必要な任意の他の遺伝子エレメントに、作動可能に連結され得る。このような遺伝子治療および送達の技術および方法は、当該分野で公知であり、例えば、WO90/11092、WO98/11779；米国特許第5693622号、同第5705151号、同第5580859号；Tabata H.ら、Cardiovasc. Res. 35(3)：470-479(1997)；Chao Jら、Pharmacol. Res. 35(6)：517-522(1997)；Wolff, J. A., Neuromuscul. Disord. 7(5)：314-318(1997)、Schwartz Bら、Gene Ther. 3(5)：405-411(1996)；Tsurumi Y.ら、Circulation 94(12)：3281-3290(1996)(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと

。

【0615】

スタニオカルシンポリヌクレオチド構築物は、注入可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法（例えば、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など）の間隙空間への注入）によって送達され得る。スタニオカルシンポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリア中で送達され得る。

【0616】

用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、細胞への侵入を補助、促進、または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈澱剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、スタニオカルシンポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法によって調製され得るリポソーム処方物（例えば、F e l g n e r P . L . ら (1 9 9 5) A n n . N Y A c a d . S c i . 7 7 2 : 1 2 6 - 1 3 9 および A b d a l l a h B . ら (1 9 9 5) B i o l . C e l l 8 5 (1) : 1 - 7 で教示されたもの）中で送達され得る。

【0617】

この遺伝子治療方法において使用されるスタニオカルシンポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列も含まない構築物である。当業者に公知の任意の強力なプロモーターが、DNAの発現を駆動するために用いられ得る。他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの間の期間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【0618】

スタニオカルシンポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する）の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、細胞間液、ムコ多

糖基質（器官組織の細網線維、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織におけるコラーゲン線維に間にある）、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下に考察する理由のために好ましい。それらは、これらの細胞を含む組織への注入によって、好都合に送達され得る。それらは、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボで、筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現する能力において、特に適格である。

【0619】

裸のスタニオカルシンポリヌクレオチド注入のために、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05g/kg体重から約50mg/kg体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約0.005mg/kgから約20mg/kgであり、そしてより好ましくは、約0.05mg/kgから約5mg/kgである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注入の組織部位に従って変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注入経路によってである。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に肺または気管支組織、咽喉、または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のスタニオカルシンポリヌクレオチド構築物が、血管形成術の間にこの手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

【0620】

インビボでの筋肉におけるスタニオカルシン注入ポリヌクレオチドの用量応答効果を、以下のようにして決定する。スタニオカルシンポリペプチドをコードするmRNAの生成のための適切なスタニオカルシン鋳型DNAを、標準的な組換えDNA方法論に従って調製する。鋳型DNA（これは環状または線状のいずれかであり得る）を裸のDNAとして使用するか、またはリポソームと複合体化する

るかのいずれかである。次いで、マウスの四頭筋に、種々の量の鑄型DNAを注入する。

【0621】

5～6週齢の雌性および雄性のBalb/Cマウスに、0.3mlの2.5% Avertinを腹腔内注射することにより麻酔する。1.5cmの切開を大腿前部で行い、そして四頭筋を直接可視化する。スタニオカルシン鑄型DNAを、0.1mlのキャリアに入れて、1cc注射器で27ゲージ針を通して1分間にわたって、筋肉の遠位挿入部位から約0.5cmのところ膝に、約0.2cmの深さで注入する。縫合を、将来の位置決定のために注入部位の上で行い、そしてその皮膚をステンレス鋼クリップで閉じる。

【0622】

適切なインキュベーション時間（例えば、7日）後、筋肉抽出物を、四頭全体を切り出すことによって調製する。個々の四頭筋の5枚毎の15μm切片を、スタニオカルシンタンパク質発現について組織化学的に染色する。スタニオカルシンタンパク質発現についてのタイムコースは、異なるマウスからの四頭を異なる時間で採取すること以外は、同様な様式で行い得る。注入後の筋肉中のスタニオカルシンDNAの持続性を、注入したマウスおよびコントロールマウスからの全細胞性DNAおよびHIRT上清を調製した後、サザンブロット分析によって決定し得る。マウスにおける上記実験の結果は、裸のスタニオカルシンDNAを用いて、ヒトおよび他の動物において適切な投薬量および他の処置パラメーターを推定するために使用し得る。

【0623】

（実施例19：スタニオカルシンの生物学的効果）

（星状細胞および神経アッセイ）

上記のように、Escherichia coliで発現され、そして精製された組換えスタニオカルシンを、皮質ニューロン細胞の生存、神経突起成長または表現形分化を促進する活性について、およびグリア線維性酸性タンパク質免疫陽性細胞、星状細胞の増殖の誘導について試験し得る。バイオアッセイのための皮質細胞の選択は、皮質構造中のFGF-1およびFGF-2の広く行き渡って

いる発現、ならびにFGF-2処理から生じる皮質ニューロン生存の以前に報告された増強に基づく。例えば、チミジン取り込みアッセイを用いて、これらの細胞に対するスタニオカルシンの活性を解明し得る。

【0624】

さらに、インビトロにおける皮質ニューロンまたは海馬ニューロンへのFGF-2(塩基性FGF)の生物学的効果を記載する以前のレポートは、ニューロン生存および神経突起成長の両方における増大を実証している(Wallick P.ら、「Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3012~3016(1986)、アッセイは、本明細書でその全体が参考として援用される)。しかし、PC-12細胞で実行される実験からの報告は、これらの2つの応答が必ずしも同義でないこと、そしてどのFGFを試験しているかだけでなく、どのレセプターが標的細胞で発現されているかにも依存し得ることを示唆する。神経突起成長を誘導するスタニオカルシンの能力を、一次の皮質ニューロン培養パラダイムを用いて、例えば、チミジン取り込みアッセイを用いてFGF-2で得られた応答と比較し得る。

【0625】

(パーキンソンモデル)

パーキンソン病における運動機能の喪失は、黒質線条体のドーパミン作動性投射ニューロンの変性から生じる線条体ドーパミンの欠乏に起因する。広範に特徴付けされたパーキンソン病の動物モデルは、1-メチル-4フェニル1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(MPTP)の全身投与を含む。CNSにおいて、MPTPは、星状細胞に取り込まれ、そしてモノアミンオキシダーゼBにより1-メチル-4-フェニルピリジン(MPP⁺)に異化され、そして放出される。引き続き、MPP⁺は、ドーパミンの高親和性再取り込みトランスポーターによりドーパミン作動性ニューロンに能動的に蓄積する。次いで、MPP⁺は、電気化学勾配によりミトコンドリア中で濃縮され、そしてニコチン酸アミドニリン酸

：ユビキノン酸化還元酵素（複合体I）を選択的に阻害し、これにより電子伝達を妨害し、そして最終的に酸素ラジカルを生成する。

【0626】

FGF-2（塩基性FGF）が黒質のドーパミン作動性ニューロンへの栄養活性を有することが組織培養パラダイムにおいて実証されている（Ferrariら、Dev. Biol. 1989）。近年、Unsicker博士のグループは、線条体のゲル型インプラントでのFGF-2投与がMPTP曝露と関連する毒性から黒質のドーパミン作動性ニューロンのほぼ完全な防御を生じることを実証している（OttoおよびUnsicker, J. Neuroscience, 1990）。

【0627】

FGF-2を用いたデータに基づいて、スタニオカルシンは、インビトロにおけるドーパミン作動性ニューロン生存を増強する際において、スタニオカルシンがFGF-2の作用と類似の作用を有するか否かを決定するために評価され得、そして、スタニオカルシンはまた、線条体におけるドーパミン作動性ニューロンを、MPTP処理と関連する損傷からの防御についてインビボで試験され得る。スタニオカルシンの潜在的効果を、まずドーパミン作動性ニューロン細胞培養パラダイムにおいてインビトロで試験する。妊娠14日のWistarラット胚由来の中脳底板を解剖することにより、培養物を調製する。組織をトリプシンで分離し、そしてポリオルチニン-ラミニンでコートしたカバーガラスに200,000細胞/cm²の密度で播いた。この細胞をダルベッコ改変イーグル培地およびホルモン補充物（NI）を含有するF12培地中で維持する。インビトロで8日後、培養物をパラホルムアミドで固定し、そしてチロシンヒドロキシラーゼ（ドーパミン作動性ニューロンについての特異的マーカー）での免疫組織化学染色のために処理する。分離した細胞培養物を胚性ラットから調製する。培養培地を3日ごとに交換し、そしてこの因子をまたその時点ごとに添加する。

【0628】

ドーパミン作動性ニューロンを妊娠14日（この発生時間は、ドーパミン作動性前駆細胞が増殖する段階を過ぎる）で動物から単離するので、チロシンヒドロ

キシラーゼ免疫陽性ニューロンの数の増加は、インビトロで生存しているドーパミン作動性ニューロンの数の増加を示す。従って、もしスタニオカルシンがドーパミン作動性ニューロンの生存を延長するように作用するならば、スタニオカルシンがパーキンソン病に関与し得ることを示唆する。

【0629】

本実施例において記載される研究は、スタニオカルシンタンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、スタニオカルシンポリヌクレオチドの活性（例えば、遺伝子治療）、スタニオカルシンのアゴニスト、および/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【0630】

本発明を、前述の説明および実施例に詳細に記載された以外の方法で実施し得ることは、明らかである。本発明の多数の改変およびバリエーションが、上記の教示を考慮して可能であり、従って、それは、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【0631】

発明の背景、詳細な説明および実施例において引用された各文書の全開示（特許、特許出願、学術文献、要約、実験マニュアル、書籍または他の開示を含む）は、本明細書中に参考として援用される。さらに、米国特許第5,837,498号の明細書および配列表は、両方とも本明細書中にその全体が参考として援用される。さらに、米国仮出願第60/161,740号の明細書および配列表もまた、その全体が参考として本明細書に援用される。

【0632】

【表3】

出願人または代理人のファイル参照番号 PF108PCT2	国際出願 割り当てられていない
---------------------------------	--------------------

寄託された微生物に関する表示

(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

7 頁、 23 行

B. 寄託物の表示

その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日

1994年1月25日

受託番号

75652

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)

この情報は追付の用紙に続く

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

欧州

EPOが求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日まで、請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能になる。(EPC規則28(4))

添付された2および3頁に続く

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する(表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

X この用紙は国際出願とともに受理された

X この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

2000年12月28日

認定官

認定官

PCT/RO/134様式 (1992年7月)

ATCC 寄託番号 75652

2 頁

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名

された独立の専門家に対してのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【0633】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0634】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

【0635】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を

、請求する。

【0636】

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルは専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

A T C C 寄託番号 P T A - 8 4 5

3頁

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0637】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする

。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト (l i s t o f r e c o g n i z e d e x p e r t s) に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0638】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (l a p s e d) される日までは、特許法31F(1)の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第22C条または第25条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

図1A-Cは、ヒトスタニオカルシン核酸配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図1B】

図1A-Cは、ヒトスタニオカルシン核酸配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図1C】

図1A-Cは、ヒトスタニオカルシン核酸配列(配列番号1)および推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図2】

図2は、BLAST分析によって決定される、ヒトスタニオカルシンタンパク質のアミノ酸配列とギンザケ (O n c o r h y n c h u s k i s u t c h) 由来のスタニオカルシンタンパク質の翻訳産物(配列番号3)との間の同一性の領域を示す。2つのポリペプチド間の同一配列に影を付け、保存的なアミノ酸をボックスとした。影付きおよび/またはボックスのアミノ酸領域を検査することによって、当業者は、2つのアミノ酸の間の保存的ドメインを容易に同定し得る。これらの保存ドメインは、本発明の好ましい実施形態である。

【図3】

図3は、ヒトスタニオカルシンアミノ酸配列の分析を示す。領域、領域、ターン領域およびコイル領域；親水性および疎水性；両親媒性領域；可撓性領域；抗原性指標および表面確率を示し、そして、記載されたコンピュータプログラムのデフォルト設定を使用して、全てを作成した。この「抗原性指標またはJameson-Wolf」グラフにおいて、正のピークは、ヒトスタニオカルシンタンパク質の高度に抗原性領域の位置を示す（すなわち、本発明のエピトープ保有領域が獲得され得る領域）。これらのグラフによって定義されたドメインは、本発明によって意図される。

図3に示されるデータはまた、表1の表形態で示される。この欄は、表題「Res」、「位置」およびローマ数字I~XIVを使用して標識される。この欄の表題は、図3および表1に示されるアミノ酸配列の以下の特徴についていう；「Res」：配列番号2および図1Aおよび1Bのアミノ酸残基；「位置」：配列番号2および図1Aおよび1B中の対応する残基の位置；I：領域-Garnier-Robson；II：領域-Chou-Fasman；III：領域-Garnier-Robson；IV：領域-Chou-Fasman；V：ターン、領域-Garnier-Robson；VI：ターン、領域-Chou-Fasman；VII：コイル、領域-Garnier-Robson；VIII：親水性プロット-Kyte-Doolittle；IX：疎水性プロット-Hopp-Woods；X：両親媒性領域-Eisenberg；XI：両親媒性領域-Eisenberg；XII：可撓性領域-Karplus-Schulz；XIII；抗原性指標-Jameson-Wolf；およびXIV：表面確率プロット-Emini。

【図4】

図4は、神経細胞株、Pajuにおけるヒトスタニオカルシン発現を誘導する上昇した細胞外カルシウム濃度を示す（実施例1を参照のこと）。細胞を5.4 mM $CaCl_2$ 中で培養し、そして、示された時点（1~48時間）で溶解した。ウサギ抗体を使用するウエスタンブロッティングは、STCの蓄積を明らかにした。時点0は、正染性（0.7 mM）培地（コントロール）中で培養したP

a j u細胞から溶解物のウエスタンブロッティングを示す。

【図5】

図5は、P a j u細胞におけるP i取り込みに対する細胞外ヒトスタニオカルシンの効果を示す。細胞を、160mM NaClを含むロック緩衝液中でインキュベートした。このリン酸塩取り込みを、125 μ M $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ と共に200ng/ml組換えスタニオカルシンの添加によって開始し、そして、放射能を示される時点で測定した。コントロールサンプルは、STCを添加しなかった。データは、平均+/-標準偏差として示す。アスタリスクは、コントロールサンプルと比較して $p < 0.05$ で有意性を示す(スチューデントt検定、 $n = 6$)。

【図6】

図6は、スタニオカルシンの過剰発現が、低酸素性傷害に対する細胞耐性を増加することを示す。

A : スタニオカルシンcDNA (P a j u / STC) で形質転換したP a j u細胞は、ウエスタンブロッティングによって示されるようにスタニオカルシンを発現した。

B : 300 μ M CoCl_2 の存在下で24時間後、コントロールP a j u / C (空のベクターで形質転換したP a j u細胞) およびP a j u / STC細胞の形態。

C : 示された期間中、 CoCl_2 で処理したP a j u / CおよびP a j u / STC細胞の細胞生存度アッセイ。

D : 示された時間中、300 μ M CoCl_2 で処理したP a j u / CおよびP a j u / STC細胞のATP含有量。データは、平均+/-標準偏差として示す。*は、コントロールサンプルと比較して $p < 0.05$ で有意性を示す(スチューデントt検定、 $n = 5 \sim 6$)。

【図7A】

図7Aは、スタニオカルシンの過剰発現が、タプシガルジンでの処置によって誘導される細胞内カルシウムの動員に対する細胞耐性を増加することを示す。

A : 無血清培養培地中10 μ Mタプシガルジンで、12時間の処置後のP a j

u / S T C および P a j u / C の形態。

B : 示された期間、タプシガルジンで処理した P a j u / C および P a j u / S T C 細胞の細胞生存度アッセイ。データは、平均 + / - 標準偏差として示す。^{*}は、コントロールサンプルと比較して $p < 0.05$ で有意性を示す (スチューデント t 検定、 $n = 5$)。

【図7B】

図7Bは、スタニオカルシンの過剰発現が、タプシガルジンでの処置によって誘導される細胞内カルシウムの動員に対する細胞耐性を増加することを示す。

A : 無血清培養培地中 $10 \mu\text{M}$ タプシガルジンで、12時間の処置後の P a j u / S T C および P a j u / C の形態。

B : 示された期間、タプシガルジンで処理した P a j u / C および P a j u / S T C 細胞の細胞生存度アッセイ。データは、平均 + / - 標準偏差として示す。^{*}は、コントロールサンプルと比較して $p < 0.05$ で有意性を示す (スチューデント t 検定、 $n = 5$)。

【図8】

図8は、梗塞性ヒト頭頂脳皮質における免疫組織学的な実証を示す。

A : 15時間齢の梗塞 (コントロール) を用いる脳の対側の半球由来の対応する領域の染色。

B : 同じ脳の梗塞性半球における損傷した領域の「境界域」の染色。

C : 3日齢の梗塞を使用する別の脳由来の「境界域」の染色。

矢印は、神経プロセスの染色を示す。

【図9】

図9は、実験的な虚血に供されたラットの脳におけるスタニオカルシンの免疫組織学的染色を示す。

A : 梗塞コア、「境界域」および末梢領域をカバーする限局的な脳虚血の誘導6時間後。

B : 、 C : 、 D : A に示される対応する領域のより大きい拡大率。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Human Genome Sciences, Inc.

<120> Stanniocalcin Proteins and Nucleic Acids and Methods Based Thereon

<130> PF108PCT2

<140> Unassigned

<141> 2000-10-26

<150> 60/161,740

<151> 1999-10-27

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1283

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (45)..(788)

<400> 1

aaaaaaaaa aaaacccaac aacttagcgg aaacttctca gaga atg ctc caa aac 56
Met Leu Gln Asn
1

tca gca gtg ctt ctg gtg ctg gtg atc agt gct tct gca acc cat gag 104
Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser Ala Thr His Glu
5 10 15 20

gcg gag cag aat gac tct gtg agc ccc agg aaa tcc cga gtg gcg gcc 152
Ala Glu Gln Asn Asp Ser Val Ser Pro Arg Lys Ser Arg Val Ala Ala
25 30 35

caa aac tca gct gaa gtg gtt cgt tgc ctc aac agt gct cta cag gtc 200
Gln Asn Ser Ala Glu Val Val Arg Cys Leu Asn Ser Ala Leu Gln Val
40 45 50

ggc tgc ggg gct ttt gca tgc ctg gaa aac tcc acc tgt gac aca gat 248
Gly Cys Gly Ala Phe Ala Cys Leu Glu Asn Ser Thr Cys Asp Thr Asp
55 60 65

ggg atg tat gac atc tgt aaa tcc ttc ttg tac agc gct gct aaa ttt 296
Gly Met Tyr Asp Ile Cys Lys Ser Phe Leu Tyr Ser Ala Ala Lys Phe
70 75 80

gac act cag gga aaa gca ttc gtc aaa gag agc tta aaa tgc atc gcc 344
Asp Thr Gln Gly Lys Ala Phe Val Lys Glu Ser Leu Lys Cys Ile Ala
85 90 95 100

aac ggg gtc acc tcc aag gtc ttc ctc gcc att cgg agg tgc tcc act 392

Asn Gly Val Thr Ser Lys Val Phe Leu Ala Ile Arg Arg Cys Ser Thr	
	105 110 115
ttc caa agg atg att gct gag gtg cag gaa gag tgc tac agc aag ctg	440
Phe Gln Arg Met Ile Ala Glu Val Gln Glu Glu Cys Tyr Ser Lys Leu	
	120 125 130
aat gtg tgc agc atc gcc aag cgg aac cct gaa gcc atc act gag gtc	488
Asn Val Cys Ser Ile Ala Lys Arg Asn Pro Glu Ala Ile Thr Glu Val	
	135 140 145
gtc cag ctg ccc aat cac ttc tcc aac aga tac tat aac aga ctt gtc	536
Val Gln Leu Pro Asn His Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr Asn Arg Leu Val	
	150 155 160
cga agc ctg ctg gaa tgt gat gaa gac aca gtc agc aca atc aga gac	584
Arg Ser Leu Leu Glu Cys Asp Glu Asp Thr Val Ser Thr Ile Arg Asp	
	165 170 175 180
agc ctg atg gag aaa att ggg cct aac atg gcc agc ctc ttc cac atc	632
Ser Leu Met Glu Lys Ile Gly Pro Asn Met Ala Ser Leu Phe His Ile	
	185 190 195
ctg cag aca gac cac tgt gcc caa aca cac cca cga gct gac ttc aac	680
Leu Gln Thr Asp His Cys Ala Gln Thr His Pro Arg Ala Asp Phe Asn	
	200 205 210
agg aga cgc acc aat gag ccg cag aag ctg aaa gtc ctc ctc agg aac	728
Arg Arg Arg Thr Asn Glu Pro Gln Lys Leu Lys Val Leu Leu Arg Asn	
	215 220 225
ctc cga ggt gag gag gac tot ccc tcc cac atc aaa cgc aca tcc cat	776
Leu Arg Gly Glu Glu Asp Ser Pro Ser His Ile Lys Arg Thr Ser His	
	230 235 240
gag agt gca taa ccagggagag gttattcaca acctcaccaa actagtatca	828
Glu Ser Ala	
	245
ttttaggggt gttgacacac cagttttgng tgtactgtgc ctggtttggt ttttttaaag	888
tagttcctat tttctatccc ccttaaagaa aattgcatga aactaggctt ctgtaatcaa	948
tatccaaca ttctgcaatg ggaggattcc caccaacaaa atccatgtga acattcttgc	1008
tctcctcagg agaaagtacc ctctttttac caacttcctc tgccatgttt tcccctgct	1068
cccctgagac ccccccaaa cacaaaacat tcatgtaact ctccagccat tgtaatttga	1128
agatgtggat ccctttagaa acggttgccc cagtagagtt agctgataag gaaactttat	1188
ttaaatgcat gtcttaaatg ctcataaaga tgttaaatgg aattcgtggt atgaatctgt	1248
gctggnccatg gacgaaaaaa aaaaaaaaaa naaaa	1283

<210> 2

<211> 247

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Leu Gln Asn Ser Ala Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Thr His Glu Ala Glu Gln Asn Asp Ser Val Ser Pro Arg Lys Ser
 20 25 30
 Arg Val Ala Ala Gln Asn Ser Ala Glu Val Val Arg Cys Leu Asn Ser
 35 40 45
 Ala Leu Gln Val Gly Cys Gly Ala Phe Ala Cys Leu Glu Asn Ser Thr
 50 55 60
 Cys Asp Thr Asp Gly Met Tyr Asp Ile Cys Lys Ser Phe Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Ala Ala Lys Phe Asp Thr Gln Gly Lys Ala Phe Val Lys Glu Ser Leu
 85 90 95
 Lys Cys Ile Ala Asn Gly Val Thr Ser Lys Val Phe Leu Ala Ile Arg
 100 105 110
 Arg Cys Ser Thr Phe Gln Arg Met Ile Ala Glu Val Gln Glu Glu Cys
 115 120 125
 Tyr Ser Lys Leu Asn Val Cys Ser Ile Ala Lys Arg Asn Pro Glu Ala
 130 135 140
 Ile Thr Glu Val Val Gln Leu Pro Asn His Phe Ser Asn Arg Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Asn Arg Leu Val Arg Ser Leu Leu Glu Cys Asp Glu Asp Thr Val Ser
 165 170 175
 Thr Ile Arg Asp Ser Leu Met Glu Lys Ile Gly Pro Asn Met Ala Ser
 180 185 190
 Leu Phe His Ile Leu Gln Thr Asp His Cys Ala Gln Thr His Pro Arg
 195 200 205
 Ala Asp Phe Asn Arg Arg Arg Thr Asn Glu Pro Gln Lys Leu Lys Val
 210 215 220
 Leu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Glu Glu Asp Ser Pro Ser His Ile Lys
 225 230 235 240
 Arg Thr Ser His Glu Ser Ala
 245

<210> 3
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Oncorhynchus kisutch

<400> 3
 Met Leu Ala Lys Phe Gly Leu Cys Ala Val Phe Leu Val Leu Gly Thr
 1 5 10 15
 Ala Ala Thr Phe Asp Thr Asp Pro Glu Glu Ala Ser Pro Arg Arg Ala
 20 25 30
 Arg Phe Ser Ser Asn Ser Pro Ser Asp Val Ala Arg Cys Leu Asn Gly
 35 40 45
 Ala Leu Ala Val Gly Cys Gly Thr Phe Ala Cys Leu Glu Asn Ser Thr
 50 55 60
 Cys Asp Thr Asp Gly Met His Asp Ile Cys Gln Leu Phe Phe His Thr

<210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 5
 gactgcatgc tccaaaactc agcagtg 27

 <210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 gactagatct tgcactctca tgggatgtgc g 31

 <210> 7
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 cagtggatcc gccacatgc tccaaaactc agcagtg 37

 <210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 cagtggatcc ggttgtgaat aacctctccc 30

 <210> 9
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 cagtggatcc gccacatgc tccaaaactc agcagtg 37

 <210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 10
 cagtggatcc ggttgtgaat aacctctccc 30


 <210> 11
 <211> 32

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
gcgctcgagg gatgacagcg atagaacccc gg 32

<210> 12
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
gcgaagcttc gcgactcccc ggatccgcct c 31

【 1 A】

```

1  GAAACTTCTCAGAGAAATGCTCCAAAATCAGCAGTGCTTCTGGTGGTGGTATCAGTGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      MetLeuGlnAsnSerAlaValLeuLeuValLeuValIleSerAla      15

TCTGCAACCCATGAGCGGAGCAGARTGACTCTGTGAGCCCCAGGAAATCCCAGTGGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
16 SerAlaThrHisGluAlaGluGlnAsnAspSerValserProArgLysSerArgValAla  35

GCCCCAAAATCAGCTGAAGTGGTTGGTCCCTCAACAGTGTCTACAGGTCGGCTGCCGGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
36 AlaGlnAsnSerAlaGluValValArgCysLeuAsnSerAlaLeuGlnValGlyCysGly  55

GCTTTTGCATGCCGTGGAATACTCCACCCTGTGACACAGATGGGATGTATGACATCTGTAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
56 AlaPheAlaCysLeuGluAsnSerThrCysAspThrAspGlyMetTyrAspIleCysLys  75

TCCTTCTTGTACAGCGCTGTAATTTGACACTCAGGGAAGCAATTCGTCAAAGAGAGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

図1β₂合わ屯子  1 A

図1Bと合わせる

```

AGCACATCAGAGACAGCCCTGATGGAGAAATGGCCCTAACATGGCCAGCCCTCTCCAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
176 SerThrIleArgAspSerLeuMetGluLysIleGlyProAsnMetAlaSerLeuPheHis 195
ATCCTGCAGACAGACCCTGTGCCCAACACACCCACGAGCTGACTTCAACAGGAGACGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
196 IleLeuGlnThrAspHisCysAlaGlnThrHisProArgAlaAspPheAsnArgArg 215
ACCAATGAGCCGAGAGCTGAAAGTCCTCCTCAGGAACCTCCGAGGTGAGGACTCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
216 ThrAsnGluProGlnLysLeuLysValLeuLeuArgAsnLeuArgGlyGluGluAspSer 235
CCCTCCCACATCAAACGCACATCCCATGAGAGTGCCATAACCAGGGAGGGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
236 ProSerHisIleLysArgThrSerHisGluSerAla 247

```

図1C

MLQNSAVLLVLVISASATHEAEQNDQSVSPRKRVAQAQNSAEVVRCLNSALQVGGGAFACL
 ML + V ++ +A + SPR++ + +V RCLN AL VGGG FACL
 MLAKFGLCAVFLVLGTAATFDTPPEASPRRARESSNSPSDVARCLNGALAVGGGTFACL

 ENSTCDTDGMYDICKSFLYSAAKFDTQKAFVKESLKCANGVTSKVF LAIRRCSTFQRM
 ENSTCDTDGM+DIC+ F ++AA F+TQK FVKESL+CIANGVTSKVF IARRC FQRM
 ENSTCDTDGMHDICQLFFHTAATFNTQKTFVKESLRCIANGVTSKVFQTIARRCGVFFQRM

 IAEVQEECYSKLVNCSIAKRNPEAITEVVQLPNHFNSRNYNRLVRSLLCEDEDTVSTIRD
 I+EVQEECYSL++C +A+ NPEAI EVVQ+P HF NRY+ L++SLL CDE+TV+ +R
 ISEVQEECYSRDLICGVARSNPEAIGEVVQVPAHFNPNYSTLLQSLACDEETVAVVRA

 SLMEKIGPNMASLFHILQTDHCAQ
 L+ ++GP+M +LF +LQ HC Q
 GLVARLGPDMETLFLQLLQNKHCPQ 204

FIG.2

【図3】

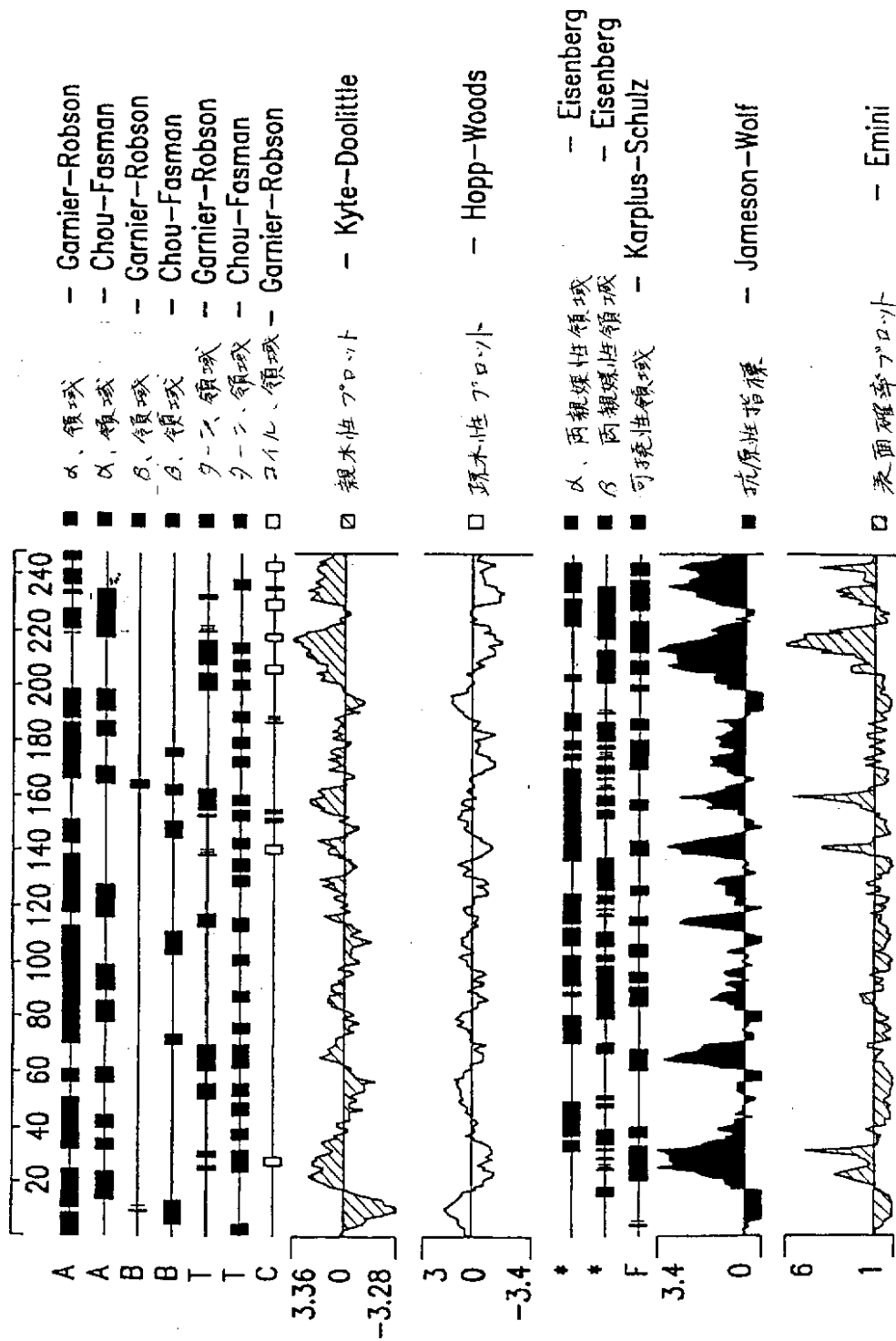


FIG.3

【図4】

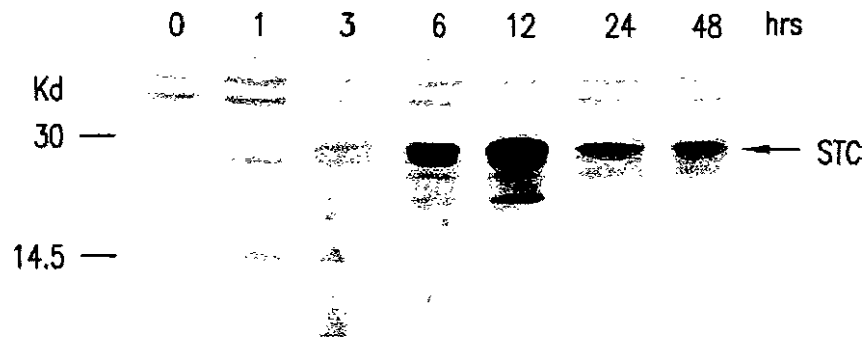


FIG.4

【図5】

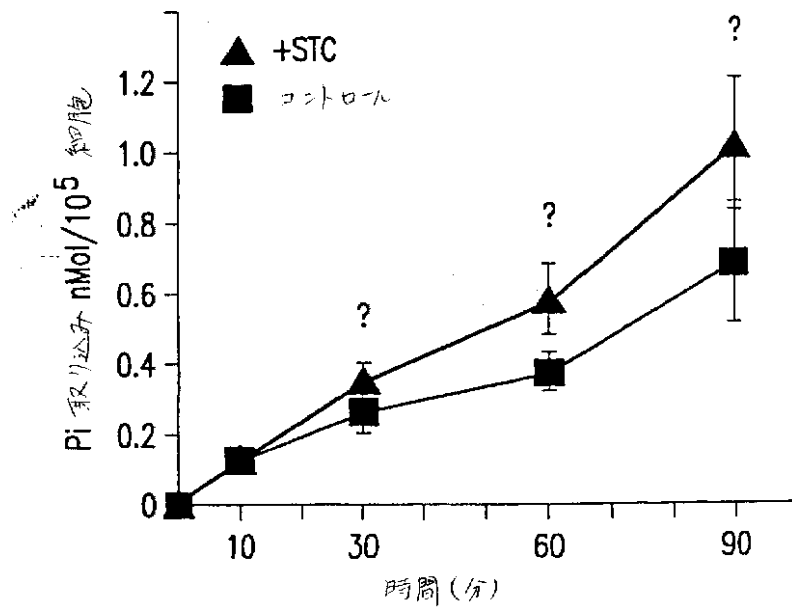


FIG.5

【図6】

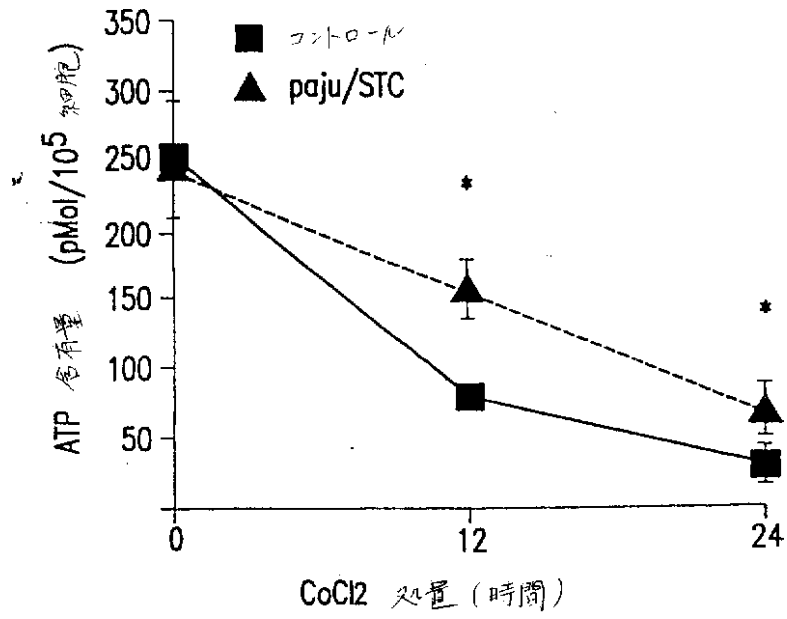


FIG.6

【図7A】

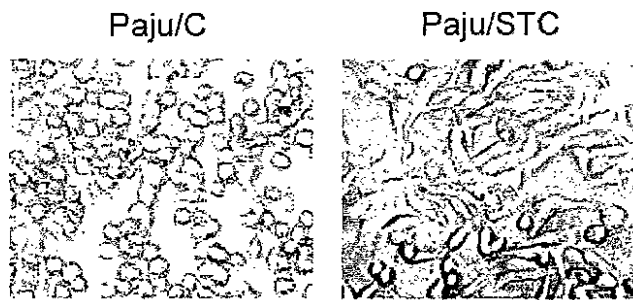


FIG.7A

【図7B】

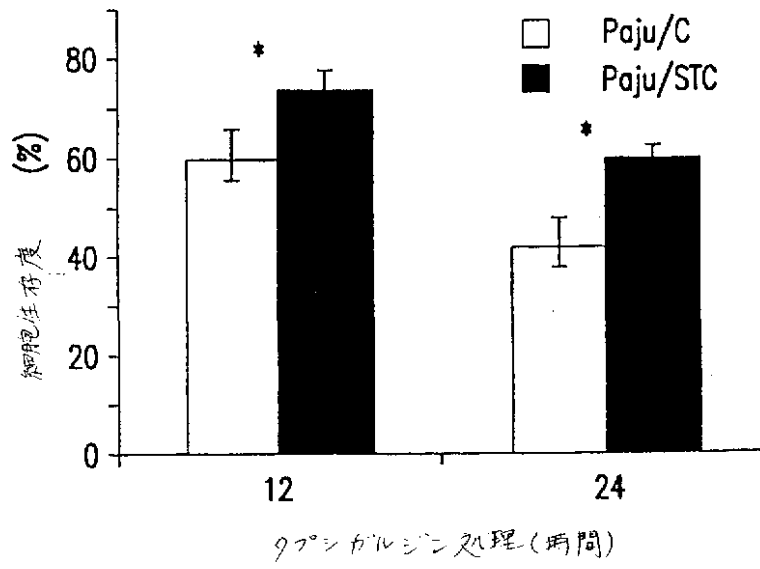


FIG. 7B


【図8A】

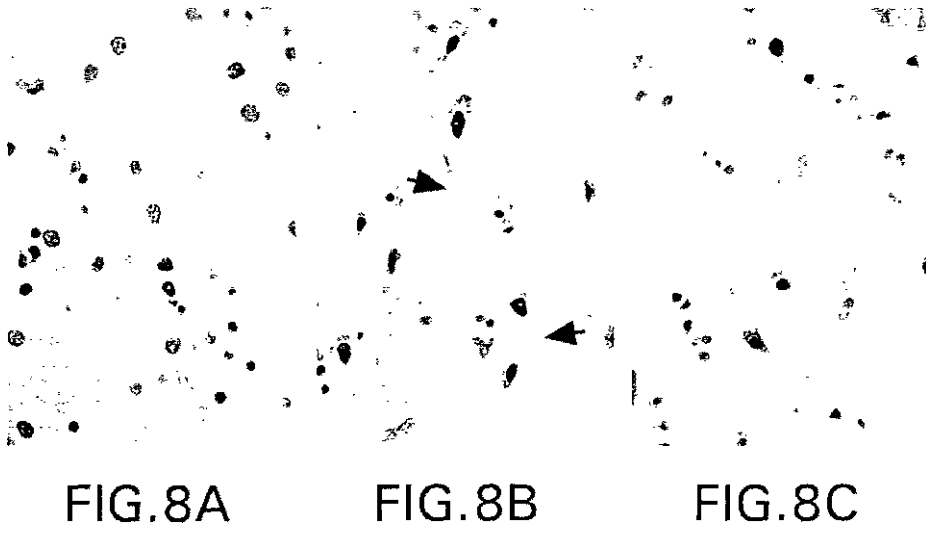



FIG. 8A

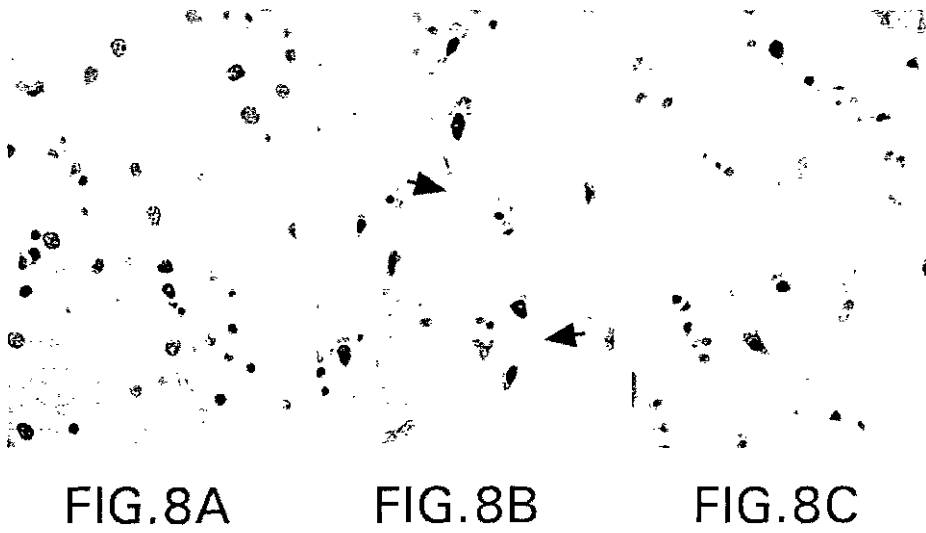
FIG. 8B

FIG. 8C

【 8 B】



【 8 C】



【图9】

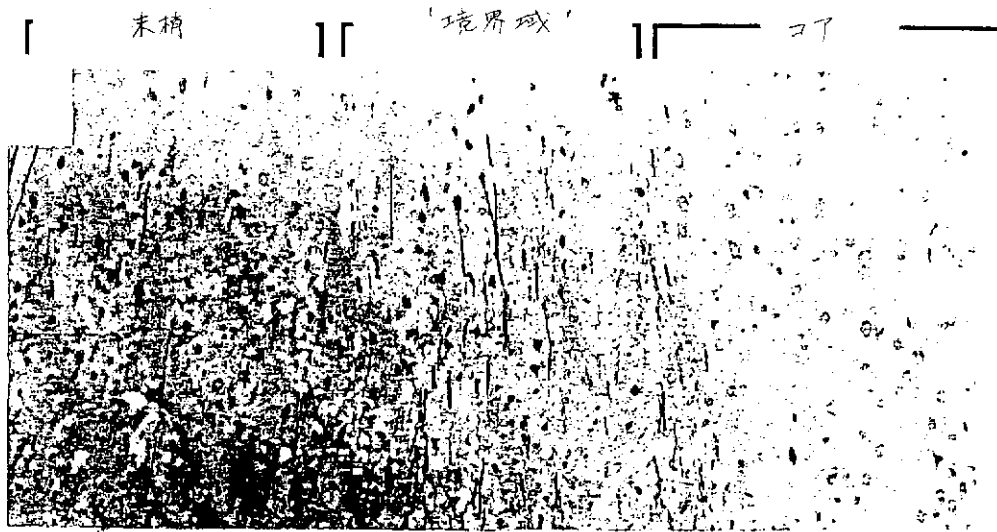


FIG.9A

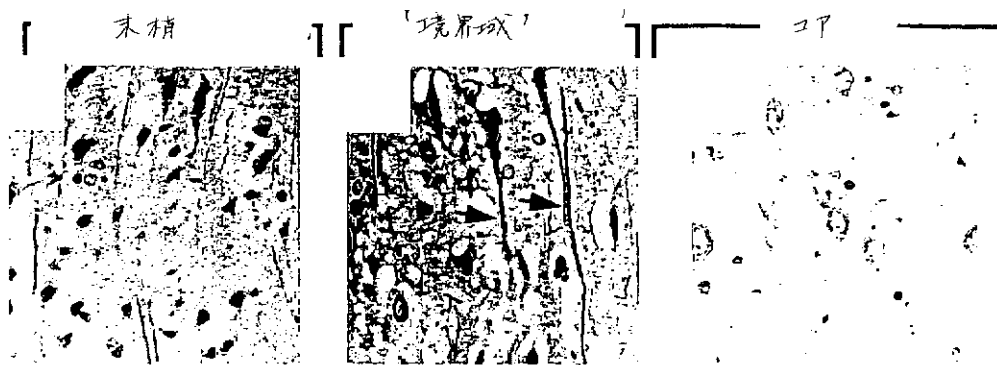


FIG.9B

FIG.9C

FIG.9D

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 9/10		A 6 1 P 25/00	
			1 0 7
	25/00		
	43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	1 0 7		
			16/18
		C 1 2 Q 1/02	
			1/68
C 1 2 Q 1/02			A
		G 0 1 N 33/53	D
		A 6 1 K 37/02	Z N A
G 0 1 N 33/53			
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

- (71)出願人 ユニバーシティ オブ ヘルシンキ
フィンランド国 エフイエヌ - 00014 ヘルシンキ, イリオピストカトゥ 4, ペーペー 33
- (72)発明者 オルゼン, ヘンリック エス.
アメリカ合衆国 メリーランド 20878, ゲイザースバーグ, ナンバー-24, ケンドリック プレイス 182
- (72)発明者 チャン, コ-チョウ
ベルギー国 ブリュッセル 1180, リュヴィクトル アラルドストラート 145
- (72)発明者 リンドベリ, ベルトゥ
フィンランド国 エフイエヌ - 00370 ヘルシンキ, キラキルコンティエ 33
- (72)発明者 タトリスマク, トゥルグト
フィンランド国 エフイエヌ - 00350 ヘルシンキ, ウルヴィランティエ 29 / 3
エフ231

図1 B.V.配列

```

AGCAGATCCAGACAGCCCTGTCGAAATTCGGCTAAGATGCCACCTCTCCNC
175 SerThrIleArgPheSerLeuMetGluLysIleGlyProMetMetAlaSerLeuPheHis 195
ATCCTTCCAGACAGACCACTGTGCCCAACACRCCRCRCGCTGACTCCACAGAGACC
196 IleLeuGlnThrPheHisCysAlaGlnThrHisProArgLysPheSerArgPheArg 215
ACCAATGAGCCGAGAGCTGAGTCTCTCCAGACGTCGAGCTGAGGAGACCTCT
216 ThrArgGluProGlnLysIleGluValIleuLeuArgAsnLeuArgGlyGluGluAspSer 235
CCCTCCACATCAACCCACCTCCCTGAGTCCATACCCGGGATGGGT
236 ProSerHisIleLysIleValArgThrSerHisGluSerAla 247

```

专利名称(译)	斯钙素蛋白和斯钙素核酸及其基于其的方法		
公开(公告)号	JP2003531107A	公开(公告)日	2003-10-21
申请号	JP2001533953	申请日	2000-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	人类基因科学公司 赫尔辛基大学		
申请(专利权)人(译)	人类Jinommu科学公司 赫尔辛基大学		
[标]发明人	オルゼンヘンリックエス チャンコチョウ リンドベリペルトウ タトリスマクトウルグト カステマルク アンデルソンレイフシー		
发明人	オルゼン, ヘンリック エス. チャン, コ-チョウ リンドベリ, ペルトウ タトリスマク, トウルグト カステ, マルク アンデルソン, レイフ シー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P7/02 A61P9/10 A61P25/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/575 C07K16/18 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P7/02 A61P9/10 A61P25/00 A61P43/00 C07K14/575		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P7/02 A61P9/10 A61P25/00 A61P43/00.107 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D A61K37/02.ZNA C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QS36 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/MA66 4C084/NA01 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA022 4C084/ZA362 4C084/ZA392 4C084/ZA542 4C084/ZA892 4C084/ZB322 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC13 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/161740 1999-10-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及人锡钙蛋白 (STC) 多核苷酸, 多肽和其他锡钙蛋白组合物, 以及基于其的新颖方法。在某些实施方案中, 本发明的锡钙素组合物用于治疗或保护神经细胞。此外, 本发明涉及载体, 宿主细胞, 抗体和重组体, 以及用于生产本发明的锡钙素组合物的合成方法。还提供了用于检测或诊断与本发明的锡钙素组合物的改变有关的疾病, 病症, 损伤或伤害的诊断方法, 以及用于治疗这种疾病, 病症, 损伤或伤害的治疗方法。它

