

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 534813

(P2003 - 534813A)

(43)公表日 平成15年11月25日(2003.11.25)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 P 1/04	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		1/16	4 B 0 2 9
A 6 1 P 1/04		1/18	4 B 0 6 3
1/16		3/10	4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全144数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 500919(P2002 - 500919)

(86)(22)出願日 平成13年5月29日(2001.5.29)

(85)翻訳文提出日 平成14年12月2日(2002.12.2)

(86)国際出願番号 PCT/US01/17478

(87)国際公開番号 W001/092308

(87)国際公開日 平成13年12月6日(2001.12.6)

(31)優先権主張番号 60/208,550

(32)優先日 平成12年6月1日(2000.6.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/223,542

(32)優先日 平成12年8月4日(2000.8.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アムジェン インコーポレーテッド
AMGEN INC.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9132
0 - 1799, サウザント オークス, ワン アム
ジェン センター ドライブ

(72)発明者 パッツィー, クリストファー ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 93003,
ベンチュラ, ウェストライド ドライブ
1027

(74)代理人 弁理士 大塩 竹志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シスチンノットポリペプチド: C L O A K E D - 2 分子およびその使用

(57)【要約】

本発明において、シスチンノットモチーフ (C × G × C および C × C) の両方を含み、そして本発明者らの高度に特異的な「 C × G c × C シスチンノットパターン」の基準に合う、ヒトの新規な分泌ポリペプチドを同定し、このポリペプチドを「 C l o a k e d - 2 」と命名した。本発明は、新規 C l o a k e d - 2 ポリペプチドおよび同一物をコードする核酸分子に関する。本発明はまた、 C l o a k e d - 2 ポリペプチドを生成するためのベクター、宿主細胞、選択的結合因子、および方法を提供する。 C l o a k e d - 2 ポリペプチドを用いて疾患を処置、診断、改善、または予防するための方法もまた提供する。

B. ヒト C l o a k e d - 2 ポリペプチドの最も予想される成熟形態

(配列番号 2)

1 QGWAQAFKNDATETIIPELGEYEPPEPELENNKTMNRAENGCRPPHPFETK
51 DVSEYSCRELHFTRYVTDGFCRSAPVTELVCSGQCSPARLLPNAIGRGK
101 WWRPSGPDFRCIPDRYRAQRVQLCPGGEAPRARKVRLVASCKCKRLITRF
151 HNQSELKDFGTAAAPQKGRKPRFRARSAKANQAELNAY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) (a)または(b)の相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

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

【請求項2】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドに少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1または配列番号3；(a)または(b)のヌクレオチド配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1もしくは配列番号3、または(a)～(c)のヌクレオチド配列；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(d)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、該ポ

リペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

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

【請求項3】 単離された核酸分子であって、以下；

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のい

ずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

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

【請求項4】 請求項1、請求項2または請求項3に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】 真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】 原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】 Cloaked-2ポリペプチドを生成するためのプロセスであって、該ポリペプチドを発現させるのに適切な条件下で請求項5に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程、を包含する、プロセス。

【請求項9】 請求項8に記載のプロセスによって生成される、ポリペプチド。

【請求項10】 請求項8に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子が、前記Cloaked-2ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された、ネイティブのCloaked-2ポリペプチドのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

【請求項11】 請求項2に記載の単離された核酸分子であって、ここで、前記同一性パーセントが、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータプログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。

【請求項12】 化合物がCloaked-2ポリペプチド活性またはCloaked-2産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項5、請求項6、または請求項7に記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該宿主細胞におけるCloaked-2ポリペプチド活性またはCloake

d - 2 産生を測定する工程、を包含する、プロセス。

【請求項13】 配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項14】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号2または配列番号4に示される成熟アミノ酸配列であって、必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、成熟アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号4のオルソログのアミノ酸配列であって、ここで該コードされるポリペプチドが、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチド活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチド活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列、または(a)～(c)の少なくとも1つに示されるアミノ酸配列のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項15】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または

配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項16】 請求項14または請求項15に記載のポリペプチドであって、ここで、配列番号2の9位のアミノ酸が、アスパラギン酸またはグルタミン酸である、ポリペプチド。

【請求項17】 請求項14または請求項15に記載のポリペプチドであって、ここで、配列番号2の39位のアミノ酸が、グリシン、プロリン、またはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項18】 請求項14または請求項15に記載のポリペプチドであって、ここで、配列番号2の58位のアミノ酸が、アルギニン、リジン、グルタミン、またはアスパラギンである、ポリペプチド。

【請求項19】 請求項14または請求項15に記載のポリペプチドであって、ここで、配列番号2の81位のアミノ酸が、バリン、イソロイシン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニン、またはノルロイシンである、ポリペプチド。

【請求項20】 請求項14または請求項15に記載のポリペプチドであって、ここで、配列番号2の102位のアミノ酸が、トリプトファン、チロシン、

またはフェニルアラニンである、ポリペプチド。

【請求項21】 請求項14または請求項15に記載のポリペプチドであって、ここで、配列番号2の154位のアミノ酸が、セリン、スレオニン、またはアラニンである、ポリペプチド。

【請求項22】 請求項1、請求項2、または請求項3に記載の核酸分子によりコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項23】 請求項14に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、前記同一性パーセントが、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータプログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。

【請求項24】 配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含むペプチドを用いて動物を免疫することによって産生される、抗体。

【請求項25】 請求項13、請求項14、または請求項15に記載のポリペプチドに特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項26】 モノクローナル抗体である、請求項25に記載の抗体。

【請求項27】 配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含むペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項28】 請求項24、請求項25、または請求項26に記載の抗Cloaked-2抗体またはフラグメントを用いて、Cloaked-2ポリペプチドの量を検出または定量する、方法。

【請求項29】 少なくとも1つのポリペプチドに特異的に結合する選択的結合因子またはそのフラグメントであって、ここで、該ポリペプチドが、以下：

(a) 配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号4の少なくとも1つに示されるアミノ酸配列のフラグメント；ならびに

(c) (a)または(b)の天然に存在する改変体、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項30】 抗体またはそのフラグメントである、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項31】 ヒト化抗体である、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項32】 ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項33】 ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項34】 モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項35】 キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項36】 CDR移植抗体またはそのフラグメントである、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項37】 抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項38】 可変領域フラグメントである、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項39】 FabフラグメントまたはFab'フラグメントである、請求項38に記載の可変領域フラグメント。

【請求項40】 配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する特異性を有する少なくとも1つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項41】 検出可能な標識に結合されている、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項42】 Cloaked-2ポリペプチドの生物学的活性に拮抗する、請求項29に記載の選択的結合因子。

【請求項43】 疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための方法であって、有効量の請求項29に記載の選択的結合因子を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項44】 配列番号2または配列番号4からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを用いて動物を免疫することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項45】 請求項1、請求項2、または請求項3に記載のポリペプチドに結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーム。

【請求項46】 請求項13、請求項14、または請求項15に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項47】 前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項46に記載の組成物。

【請求項48】 前記ポリペプチドが、配列番号2または配列番号4に示される成熟アミノ酸配列を含む、請求項46に記載の組成物。

【請求項49】 請求項13、請求項14、または請求項15に記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項50】 水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項49に記載のポリペプチド。

【請求項51】 請求項50に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項52】 請求項1、請求項2または請求項3に記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項53】 前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項52に記載の組成物。

【請求項54】 請求項1、請求項2または請求項3に記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項55】 異種アミノ酸配列に融合された、請求項13、請求項14、または請求項15に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項56】 前記異種アミノ酸配列が、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項55に記載の融合ポリペプチド。

【請求項57】 医学的状态を処置、予防、または改善するための方法であって、請求項13、請求項14、もしくは請求項15に記載のポリペプチド、または請求項1、請求項2、もしくは請求項3に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項58】 被験体における病理的状态または病理的状态に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) サンプル中の、請求項13、請求項14、もしくは請求項25に記載のポリペプチド、または請求項1、請求項2、もしくは請求項3に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの、発現の存在または発現量を決定する工程；および

(b) 該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づき、病理的状态または病理的状态に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

【請求項59】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適した膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞、を備え、ここで、該細胞は、請求項13、請求項14、もしくは請求項15に記載のタンパク質を分泌し、該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項60】 ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

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

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

【請求項61】 動物においてポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項1、請求項2、または請求項3に記載の核酸分子を該動物に投与する

工程を包含する、方法。

【請求項62】 請求項1、請求項2、または請求項3に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本願は、2000年6月1日出願の米国仮特許出願第60/208,550号および2000年8月4日出願の米国仮特許出願第60/223,542号の優先権を主張する。

【0002】**(発明の分野)**

本発明は、新規なCloaked-2ポリペプチドおよびこのポリペプチドをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、Cloaked-2ポリペプチドを産生するための、ベクター、宿主細胞、薬学的組成物、選択的結合因子および方法に関する。本発明はまた、Cloaked-2ポリペプチドと関連する疾患の診断、処置、改善、および/または予防のための方法を提供する。

【0003】**(発明の背景)**

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療剤の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と合わされて、ゲノムの一部および全体へと重複配列を集合すること、ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の目印に対して相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

【0004】

過去10年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に関する可能性は、未だほとんど実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド（これらは、治療分子に対して「標的」としてはた

らき得る)は、未だ同定されていない。

【0005】

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

【0006】

このシスチンノット(cystine-knot)増殖因子構造スーパーファミリーは、以下の4種ファミリーから構成される: TGF- β (形質転換増殖因子 β)、PDGF (血小板誘導増殖因子)、NGF (神経増殖因子)および糖タンパク質ホルモン。これらのファミリー間に有意なアミノ酸相同性は存在しないが、これらのファミリーの種々のメンバーについて決定された結晶構造は、顕著に類似しており、そしてこれらの分類を構造スーパーファミリーに導いた。Isaacs、Current Opinion in Structural Biology、5:391-395(1995)を参照のこと。この3次元的な類似性は、このタンパク質のクラスについての大部分の構造的な決定要因が、「シスチンノット」と呼ばれる6個のシステイン(3個のジスルフィド)構造であるという事実に起因し得る。TGF- β 、PDGF、および糖タンパク質ホルモンのファミリーの全メンバーについて、システイン番号2および3が、モチーフ「C x G x C」において見出され、そしてシステイン番号5および6が、モチーフ「C x C」で見出される(ここで、「x」は、任意のアミノ酸をいう)。このシスチンノット増殖因子構造スーパーファミリーの全メンバーは、分泌シグナル伝達分子である。

【0007】

発明者らは、未同定のシスチンノットファミリーが存在すると仮定し、もしそうであれば、このようなファミリーのメンバーは、公知のシスチンノット増殖因子ファミリーメンバーと有意な相同性を有さず、従って、コンピュータアプローチ(例えば、Blastサーチ、プロフィールサーチなど)に基づく標準的な相同性を使用して同定され得ない。しかし、このようなファミリーの任意のメンバーは、シスチンノットモチーフを含む。

【0008】

(発明の要旨)

新規な分泌シグナル伝達分子を同定する目的で、高度に特異的な「C x G x C クラスのシスチンノットパターン」を、データベースマイニング (mining) のために開発した。このパターンは、公知のC x G x Cクラスのシスチンノットタンパク質を同定するのに関して、かなり特異的である。シグナルペプチドの存在、膜貫通ドメインの欠損、および550個未満の総ポリペプチドサイズを、第二のスクリーニング基準として使用した。シスチンノットモチーフ (C x G x C および C x C) の両方を含み、そして本発明者らの高度に特異的な「C x G x C シスチンノットパターン」の基準に合う、ヒトの新規な分泌ポリペプチドを、ここで同定し、そして本明細書中で「Cloaked - 2」と呼ぶ。このマウス「Cloaked - 2」ポリペプチドもまた、同定した。GAP分析は、全長ヒトCloaked - 2ポリペプチドとマウスCloaked - 2ポリペプチドとの間で、88%のアミノ酸同一性が存在することを明らかにする。マウスCloaked - 2は、シスチンノットモチーフ (C x G x C および C x C) の両方を含み、そして本発明者の高度に特異的な「C x G x C シスチンノットパターン」の基準に合う。従って、Cloaked - 2は、シスチンノットタンパク質の新しいファミリーのメンバーであり、これは、ヒトおよびマウスの両方のCloaked - 2が、2種類の従来のシスチンノットモチーフ (C x G x C および C x C) を含み、本発明者の高度に特異的な「C x G x C シスチンノットパターン」の基準に合い、予想されるシグナルペプチドのN末端を有し、予想されない膜貫通ドメインを有し、そしてそれぞれ550個の未満のアミノ酸サイズであるという事実に基づく。

【0009】

ヒトゲノム中の公知の遺伝子の中で、Cloaked - 1は、Cloaked - 2に最も関連し、そしてこれらの2種の遺伝子は、かなりより離れた関連性を有する遺伝子と比較した場合に、不一致のサブグループを含む。各ポリペプチドは、8種の保存的シスチンを含む。GAP分析は、ヒトCloaked - 1の成熟形態とヒトCloaked - 2の成熟形態との間で、43%のアミノ酸同一性が存在することを明らかにする (図4)。さらに、この従来のシスチンノットモ

チーフ (C x G x C および C x C) は保存され、そして4種のさらに保存されたシスチンが、図4において同様に全て同定される。C x G x C および C x C モチーフ中のシスチンは、シスチンノットを形成する6個のシスチンのシスチン番号2および3、そして5および6をそれぞれ表す。このシスチンノットのシスチン番号1は、C l o a k e d - 1 のシスチン52または66およびC l o a k e d - 2 のシスチン57または71のいずれかである。シスチンノットのシスチン番号4は、C l o a k e d - 1 のシスチン110または124およびC l o a k e d - 2 のシスチン111または125のいずれかである。全ての公知のシスチンノットポリペプチドに関して、6個のシスチンは、以下の組み合わせにおいて3個のジスルフィド結合を形成する：シスチン番号1および4、シスチン番号2および5、シスチン番号3および6。

【0010】

従って、本発明は、新規なC l o a k e d - 2 核酸分子およびコードされたポリペプチドに関する。

【0011】

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

(a) 配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) (a) または (b) の相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

(d) (a) ~ (c) のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

【0012】

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

(a) 配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドに少なくとも約7

0%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされるポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1または配列番号3；(a)または(b)のヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1もしくは配列番号3、または(a)～(d)のヌクレオチド配列；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(d)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a)～(d)のいずれかに対して相補的なヌクレオチド配列。

【0013】

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

(a) 少なくとも1つの保守的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有

する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)～(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0014】

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

(a) 必要に応じて、アミノ末端メチオニンをさらに含む、配列番号2に示される成熟アミノ鎖配列；または必要に応じて、アミノ末端メチオニンをさらに含む、配列番号4に示される、成熟アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号4のオルソログのアミノ酸配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドが、配列番号2または配列番号4に示され

るポリペプチド活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチド活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列または(a)~(c)の少なくとも1つに示されるアミノ酸配列のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列であって、ここでこのポリペプチドが、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0015】

本発明は、以下ならなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドをさらに提供する：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；な

らびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号4に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0016】

上記(a)～(e)のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。

【0017】

本発明はまた、本明細書中に示される単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示される組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、ならびにCloaked-2ポリペプチドを産生する方法であって、宿主細胞を培養する工程およびこの産生されたポリペプチドを必要に応じて単離する工程を包含する方法を提供する。

【0018】

Cloaked-2ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト動物はまた、本発明に含まれる。Cloaked-2核酸分子は、Cloaked-2ポリペプチドの発現および増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含む）を可能にする様式で、動物中に導入される。このトランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは、哺乳動物である。

【0019】

本発明のCloaked-2ポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【0020】

配列番号2のCloaked-2ポリペプチドの保存的および非保存的なアミノ酸置換から得られる、Cloaked-2のアナログが、本発明において提供される。このようなアナログは、以下を含む：9位のアミノ酸が、アスパラギン酸またはグルタミン酸からなる群から選択される、Cloaked-2ポリペプチド；39位のアミノ酸が、グリシン、プロリン、またはアラニンからなる群か

ら選択される、C l o a k e d - 2 ポリペプチド；58位のアミノ酸が、アルギニン、リジン、グルタミンまたはアスパラギンからなる群から選択される、C l o a k e d - 2 ポリペプチド；81位のアミノ酸が、バリン、イソロイシン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニン、またはノルロイシンからなる群から選択される、C l o a k e d - 2 ポリペプチド；102位のアミノ酸が、トリプトファン、チロシン、またはフェニルアラニンからなる群から選択される、C l o a k e d - 2 ポリペプチド；154位のアミノ酸が、セリン、トレオニン、またはアラニンからなる群から選択される、C l o a k e d - 2 ポリペプチド。

【0021】

さらに、本発明のC l o a k e d - 2 ポリペプチドに特異的に結合し得る抗体およびペプチドのような選択的結合因子が、提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。

【0022】

本発明のヌクレオチド、ポリヌチド、または選択的結合因子、および1以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む、薬学的組成物はまた、本発明に含まれる。この薬学的組成物は、本発明の治療有効量のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、ポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0023】

本発明のC l o a k e d - 2 ポリペプチドおよび核酸分子は、疾患および障害（本明細書中で引用されるものを含む）を処置、予防、改善、および/または決定するために使用され得る。

【0024】

本発明はまた、C l o a k e d - 2 ポリペプチドと結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、C l o a k e d - 2 ポリペプチドを試験分子と接触させる工程、およびこの試験分子のこのポリペプチドに結合する範囲を決定する工程を包含する。この方法は、さらに、このような試験分子が、C l o a k e d - 2 ポリペプチドのアゴニストまたはアン

タゴニストであるかどうかを決定する工程を包含する。本発明は、さらに、C l o a k e d - 2 ポリペプチドの発現またはC l o a k e d - 2 ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0025】

C l o a k e d - 2 ポリペプチドの発現を調節する方法およびレベルを調整（すなわち、増加または減少）する方法もまた、本発明に含まれる。1つの方法は、C l o a k e d - 2 ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、C l o a k e d - 2 ポリペプチドの発現を調節または調整するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中でさらに記載されているような、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0026】

本発明の別の局面において、C l o a k e d - 2 ポリペプチドは、それらのレセプター（「C l o a k e d - 2 レセプター」）を同定するために使用され得る。「発現クローニング」の種々の形態は、タンパク質リガンドに対するレセプターをクローニングするために広範に使用されている。例えば、H . S i m o n s e n および H . F . L o d i s h , T r e n d , P h a r m a c o l o g i c a l S c i e n c e s , 第15巻、437~441(1994)、ならびに T a r t a g l i a ら、C e l l , 83:1263~1271(1995)を参照のこと。C l o a k e d - 2 レセプターの単離は、C l o a k e d - 2 ポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性C l o a k e d - 2 レセプター、抗C l o a k e d - 2 レセプター選択的結合因子（例えば、抗体およびそれらの誘導体）、小分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド（これらのいずれかは、1以上の疾患または障害（本明細書中で引用されるものを含む）を処置するために使用され得る）が挙げられる。

【0027】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして

記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本願において列挙される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される。

【0028】

(定義)

用語「Cloaked-2遺伝子」または「Cloaked-2核酸分子」あるいは「ポリヌクレオチド」とは、配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-1616またはPTA-1615におけるDNAインサートのヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むか、またはこれらからなる核酸分子をいう。

【0029】

用語「Cloaked-2ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連するポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、Cloaked-2ポリペプチド対立遺伝子改変体、Cloaked-2ポリペプチドオルソログ、Cloaked-2ポリペプチドスプライス改変体、Cloaked-2ポリペプチド改変体およびCloaked-2ポリペプチド誘導体が挙げられる。Cloaked-2ポリペプチドは、本明細書中で定義されるような成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

【0030】

用語「Cloaked-2ポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可成りいくつかの代替的形態のうちの1つをいう。

【0031】

用語「Cloaked-2ポリペプチド誘導体」は、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチド、本明細書中で定義されるCloaked-2ポリペプチド対立遺伝子改変体、Cloaked-2ポリペプチドオルソログ、Cloaked-2ポリペプチドスプライス改変体、またはCloaked-2ポリペプチド改変体をいい、これらは、化学的に改変されている。

【0032】

用語「C l o a k e d - 2ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号4において示されるC l o a k e d - 2ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸の付加または置換または内部欠失を有する（ここで、得られたポリペプチドは、少なくとも6アミノ酸長以上である）、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチド、C l o a k e d - 2ポリペプチド対立遺伝子改変体、C l o a k e d - 2ポリペプチドオルソログ、C l o a k e d - 2ポリペプチドスプライス改変体および/またはC l o a k e d - 2ポリペプチド改変体の、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）での短縮化（t r u n c a t i o n）および/またはカルボキシル末端での短縮化を含むポリペプチドをいう。C l o a k e d - 2ポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシング、またはインビボプロテアーゼの作用から生じ得る。好ましい実施形態において、短縮化は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含む。このようなC l o a k e d - 2ポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、C l o a k e d - 2ポリペプチドに対する抗体を生成するために使用され得ることが理解される。

【0033】

用語「C l o a k e d - 2融合ポリペプチド」は、配列番号2または配列番号4に示されるC l o a k e d - 2ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸の欠失、置換または内部付加を有する、配列番号2または配列番号4に示されるポリペプチド、C l o a k e d - 2ポリペプチド対立遺伝子改変体、C l o a k e d - 2ポリペプチドオルソログ、C l o a k e d - 2ポリペプチドスプライス改変体、またはC l o a k e d - 2ポリペプチド改変体のアミノ末端またはカルボキシル末端での、1つ以上のアミノ酸（例えば、異種ペプチドま

たはポリペプチド)の融合をいう。

【0034】

用語「Cloaked - 2ポリペプチドオルソログ(ortholog)」は、配列番号2または配列番号4に示されるようなCloaked - 2ポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのCloaked - 2ポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0035】

用語「Cloaked - 2ポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2または配列番号4に示されるCloaked - 2ポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子(通常はRNA)をいう。

【0036】

用語「Cloaked - 2ポリペプチド改変体」は、配列番号2または配列番号4(リーダー配列を有するかまたは有さない)に示されるCloaked - 2ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失(例えば、内部欠失および/またはCloaked - 2ポリペプチドフラグメント)、および/または付加(例えば、内部付加および/またはCloaked - 2融合ポリペプチド)を有するアミノ酸配列を含むCloaked - 2ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する(例えば、Cloaked - 2ポリペプチド対立遺伝子改変体、Cloaked - 2ポリペプチドオルソログ、およびCloaked - 2ポリペプチドスプライス改変体)か、または、人工的に構築され得る。このようなCloaked - 2ポリペプチド改変体は、配列番号1または配列番号3に示されるDNA配列から変化するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1~3、または1~5、または1~10、または1~15、または1~20、または1~25、または1~50、または1~75、または1~100、または100より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および/または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

【0037】

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

【0038】

用語「生物学的に活性なC1oaked-2ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を有するC1oaked-2ポリペプチドをいう。

【0039】

用語「有効量」および「治療有効量」は、各々、本明細書中に示されるC1oaked-2ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるC1oaked-2ポリペプチドまたはC1oaked-2核酸分子の量をいう。

【0040】

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

【0041】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいうために使用される。この用語には、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

【0042】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定されるような、核酸分

子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって位置づけられた、ギャップアラインメントを有する（存在する場合）2つ以上の配列のうち小さなもの間の同一の一致のパーセントを測定する。

【0043】

用語「類似性」は、関連する概念であるが、「同一性」とは対照的に、同一の一致および保存的置換の一致の両方を含む類似性の程度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば10/20の同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、パーセント同一性および類似性は、どちらも50%である。同じ例において、保存的置換であるさらに5つの位置が存在する場合、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセント類似性は75%（15/20）である。したがって、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド間のパーセント類似性の程度は、これらの2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

【0044】

用語「単離された核酸分子」とは、（1）総DNAが供給源細胞から単離される場合に、これが天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子、（2）「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、（3）天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、または（4）より大きなポリヌクレオチド配列の一部として、天然には存在しない本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、任意の他の混入核酸分子、またはその天然の環境において見出される他の混入物（これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）を実質的に含まない。

【0045】

用語「単離されたポリペプチド」とは、（1）供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の物

質の少なくとも約50%から分離された本発明のポリペプチド、(2)「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に(共有結合的または非共有結合的相互作用によって)連結していない、本発明のポリペプチド、(3)天然には連結しないポリペプチドに(共有結合的または非共有結合的相互作用によって)作動可能に連結する、本発明のポリペプチド、または(4)天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、任意の他の混入ポリペプチドまたはその天然の環境において見出される他の混入物(これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる)を実質的に含まない。

【0046】

用語「成熟Cloaked-2ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したCloaked-2ポリペプチドをいう。成熟Cloaked-2ポリペプチドはまた、他の改変(例えば、アミノ末端(リーダー配列を有するかまたは有さない)および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N結合型および/またはO結合型グリコシル化など)を含み得る。例示的な成熟ヒトCloaked-2ポリペプチドは、配列番号2によって示される。例示的なマウスCloaked-2ポリペプチドは、配列番号4によって示される。

【0047】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNAまたはRNA配列をいう。これらの用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない: 4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン(pseudoisocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシ-メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルア

デニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - メチルアデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノ - メチル - 2 - チオウラシル、 β - D - マンノシルキューオシン (β - D - mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボニル - メチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシブトキソシン (oxybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、および2, 6 - ジアミノプリン。

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのCloaked-2ポリペプチド、Cloaked-2核酸分子、またはCloaked-2選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な1つ以上の処方材料をいう。

【0051】

用語「選択的結合因子」とは、Cloaked-2ポリペプチドに特異性を有する分子（単数または複数）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子が、ヒトCloaked-2ポリペプチドに結合し、かつヒト非Cloaked-2ポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2または配列番号4に記載されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間型（例えば、マウスポリペプチドおよびラットポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。

【0052】

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

【0053】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外因性または異種DNAの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入された場合に「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術が、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、Virology 52:456(1973); Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories (New York, 1989); Davisら、Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, 1986); および Chuら、Gene 13:197(1981)を参照のこと。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

【0054】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含有するように改変された場合に形質転換されている。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、形質転換したDNAは、細胞の染色体に物理的に組み込まれることにより細胞のDNAと組換わり得るか、複製されることなしにエピソードエレメントとして一過的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製し得る。DNAが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたとみなされる。

【0055】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

【0056】

（核酸分子および／またはポリペプチドの関連性）

関連した核酸分子が、配列番号1または配列番号3の核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含むこと、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むことが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号4におけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／または欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0057】

フラグメントは、配列番号2または配列番号4のポリペプチドの少なくとも約25アミノ酸残基、または約50アミノ酸残基、または約75アミノ酸残基、または約100アミノ酸残基、または100より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする分子を含む。

【0058】

さらに、関連したCloaked-2核酸分子としては、本明細書中で定義したような中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1もしくはは

配列番号3の核酸分子、またはポリペプチド（このポリペプチドは、配列番号2もしくは配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む）をコードする分子、または本明細書中に定義したような核酸フラグメント、または本明細書中に定義したようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントに対して十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が挙げられる。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供されるCloaked-2配列を用いてcDNA、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーを、関連した配列についてスクリーニングして調製され得る。Cloaked-2ポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列の、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

【0059】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が高度に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ著しく不一致なDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは42℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrook, Fritsch&Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、(Cold Spring Harbor, N.Y. 1989); Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: a practical approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford England)を参照のこと。

【0060】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響を受ける。他の薬剤は、非特異的および/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム（ NaDodSO_4 すなわちSDS）、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH 6.8 ~ 7.4で実施されるが、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHにほとんど依存しない。Andersonら, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach*, 第4章, IRL Press Limited (Oxford England)を参照のこと。

【0061】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって推定され得る：

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

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

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

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

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

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

【0065】

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

【0066】

別の実施形態において、関連した核酸分子は、配列番号1もしくは配列番号3に示されるようなヌクレオチド配列に対して約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号2もしくは配列番号4に示されるようなポリペプチドに対して約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態において、ヌクレオチド配列は、配列番号1もしくは配列番号3に示されるようなヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号2もしくは配列番号4に示されるようなポリペプチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。

【0067】

核酸配列における差異は、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的改変および/または非保存的改変を生じ得る。

【0068】

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

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0072】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーとの交換を含み得る。このような置換された残基は、非ヒトCloaked-2ポリペプチドオルソログと相同なヒトCloaked-2ポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同領域に導入され得る。

【0073】

このような変更を行う際に、アミノ酸のハイドロパシー指数(hydropathic index)が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて、ハイドロパシー指数を割り当てられている。ハイドロパシー指数は、以下である：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン

(+ 3 . 8) ; フェニルアラニン (+ 2 . 8) ; システイン / シスチン (+ 2 . 5) ; メチオニン (+ 1 . 9) ; アラニン (+ 1 . 8) ; グリシン (- 0 . 4) ; スレオニン (- 0 . 7) ; セリン (- 0 . 8) ; トリプトファン (- 0 . 9) ; チロシン (- 1 . 3) ; プロリン (- 1 . 6) ; ヒスチジン (- 3 . 2) ; グルタミン酸 (- 3 . 5) ; グルタミン (- 3 . 5) ; アスパラギン酸 (- 3 . 5) ; アスパラギン (- 3 . 5) ; リジン (- 3 . 9) ; およびアルギニン (- 4 . 5) 。

【 0 0 7 4 】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能を確認する際の、ハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において理解されている (K y t e ら、 J . M o l . B i o l .、 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 1 (1 9 8 2)) 。 特定のアミノ酸が、類似のハイドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに使用され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ハイドロパシー指数に基づいて変更を行う際に、ハイドロパシー指数が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして $\pm 0 . 5$ 以内であるものが、なおより特に好ましい。

【 0 0 7 5 】

類似のアミノ酸の置換が、親水性に基づいて効果的になされ得る (特に、これによって作製された生物学的に機能的に等価なタンパク質またはペプチドは、この場合と同様に、免疫学的実施形態における使用のために意図される) こともまた、当該分野において理解されている。その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるような、タンパク質の最も大きな局所的な平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関する。

【 0 0 7 6 】

以下の親水性の値が、アミノ酸残基に割り当てられた : アルギニン (+ 3 . 0) ; リジン (+ 3 . 0) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0 $\pm$ 1) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0 $\pm$ 1) ; セリン (+ 0 . 3) ; アスパラギン (+ 0 . 2) ; グルタミン (+ 0 . 2) ; グリシン (0) ; スレオニン (- 0 . 4) ; プロリン (- 0 . 5 $\pm$ 1) ; アラニン (- 0 . 5) ; ヒスチジン (- 0 . 5) ; システイン (- 1 . 0

);メチオニン(-1.3);バリン(-1.5);ロイシン(-1.8);イソロイシン(-1.8);チロシン(-2.3);フェニルアラニン(-2.5);およびトリプトファン(-3.4)。類似の親水性の値に基づいて変更を行う際に、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。エピトープをまた、一次アミノ酸配列から、親水性に基づいて同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」と呼ばれる。

【0077】

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

【0078】

例示的なアミノ酸置換を、表Iに示す。

【0079】

【表1】

表I アミノ酸置換

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジ"アミ)-酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

当業者は、配列番号2または配列番号4に示されるようなポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。活性を破壊することなく変更され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合、当業者は、Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドに対して比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存

される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、C l o a k e d - 2 ポリペプチドの領域における変化が、C l o a k e d - 2 ポリペプチドの生物学的活性および/または構造にさほど不利に影響を与えないようであることが、理解される。当業者にはまた、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸を、活性を維持しながら天然に存在する残基で置換し得ることが公知である（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に悪影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0080】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造 - 機能研究を再検討し得る。このような比較の観点において、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応する、C l o a k e d - 2 ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、C l o a k e d - 2 ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基について、化学的に類似のアミノ酸の置換を選択し得る。

【0081】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造に関して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の観点において、当業者は、C l o a k e d - 2 ポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面に存在すると予測されるアミノ酸残基に急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各所望のアミノ酸残基に含む、試験改変体を作製し得る。次いで、これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変更が、破壊された活性、所望でなく減少した活性、または所望でない活性を生じたことを

発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0082】

本発明のCloaked-2ポリペプチドアナログは、Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列を関連のファミリーメンバーと比較することによって決定され得る。例示的なCloaked-2ポリペプチド関連のファミリーメンバーとしては、Cloaked-1が挙げられるが、これに限定されない。この比較は、保存された領域および保存されていない領域内で、複数のファミリーメンバーとのPileupアラインメント(Wisconsin GCG Program Package)比較または等価な(重複する)比較を使用することによって達成され得る。

【0083】

図4に示すように、Cloaked-2ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号2)は、ヒトCloaked-1ポリペプチド(配列番号25)と整列される。他のCloaked-2ポリペプチドアナログは、これらの方法および当業者に公知の他の方法を使用して決定され得る。これらの重複する配列は、さらなるCloaked-2アナログを生じる保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換についてのガイダンスを提供する。これらのアミノ酸置換が天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸からなり得ることが、理解される。例えば、図4に示されるように、これらの関連のポリペプチドのアラインメントは、潜在的なCloaked-2アナログが、配列番号2の9位でグルタミン酸に置換されるアスパラギン酸残基；配列番号2の39位でプロリンまたはアラニンに置換されるグリシン残基；配列番号2の58位でリジン、グルタミンまたはアスパラギンに置換されるアルギニン残基；配列番号2の81位でイソロイシン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニンまたはノルロイシンに置換されるバリン残基；配列番号2の102位でチロシンまたはフェニルアラニンに置換されるトリプトファン残基；および、配列番号2の154位でスレオ

ニンまたはアラニンに置換されるセリン残基を有し得ることを示す。

【0084】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Moult J.、Curr. Opin. Biotech.、7(4):422-427(1996)、Chouら、Biochemistry、13(2):222-245、(1974); Chouら、Biochemistry、113(2):211-222(1974); Chouら、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.、47:45-148(1978); Chouら、Ann. Rev. Biochem.、47:251-276およびChouら、Biophys. J.、26:367-384(1979)を参照のこと)。さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。二次構造を推定する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より大きな配列同一性または40%より大きな類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長は、二次構造(ポリペプチドまたはタンパク質の構造における可能な折り畳みの数を含む)の増強された推定性を提供してきた。Holmら、Nucl. Acid. Res. 27(1):244-247(1999)を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された多数の折り畳みが存在すること、および一旦、重要な数の構造が解析されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた(Brennerら、Curr. Op. Struct. Biol. 7(3):369-376(1997))。

【0085】

二次構造を予測するさらなる方法としては、「スレッディング(threading)」(Jones, D.、Curr. Opin. Struct. Biol.、7(3):377-87(1997); Sipplら、Structure、4(1):15-9(1996))、「プロフィール分析」(Bowieら、Science. 253:164-170(1991); Gribskovら、Meth. Enzym.、183:146-159(1990); Gribsk

ovら、Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13)4355-4358(1987))、および「進化的連鎖(evolutionary linkage)」(Home、前出、およびBrenner、前出を参照のこと)が、挙げられる。

【0086】

好ましいCloaked-2ポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、Cloaked-2ポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN連結グリコシル化部位を含む。N連結グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N連結炭水化物鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN連結炭水化物鎖を除去する。1つ以上のN連結グリコシル化部位(代表的に、天然に存在するグリコシル化部位)が排除され、そして1つ以上の新たなN連結部位が作製される、N連結炭水化物鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいCloaked-2改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2または配列番号4に記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、Cloaked-2ポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な配置にリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には同数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0087】

さらに、配列番号2もしくは配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはCloaked-2ポリペプチド改変体は、相同なポリペプチドに融合され

てホモダイマーを形成し得るか、または異種のポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：C l o a k e d - 2 融合タンパク質の検出および/または単離を可能するためのエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその一部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドまたはその一部分；触媒活性である酵素またはその一部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加するポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2もしくは配列番号4に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはC l o a k e d - 2 ポリペプチド改変体とは異なる治療活性を有するポリペプチド。

【0088】

融合は、配列番号2もしくは配列番号4に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはC l o a k e d - 2 ポリペプチド改変体のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかでなされ得る。融合は、リンカー分子またはアダプター分子なしで直接的であり得るか、あるいはリンカー分子またはアダプター分子を使用して間接的であり得る。リンカー分子またはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基、代表的には約20～約50個のアミノ酸残基であり得る。リンカー分子またはアダプター分子はまた、DNA制限エンドヌクレアーゼ、またはプロテアーゼの切断部位を有するように設計され得、融合部分の分離を可能にする。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法に従って誘導され得ることが理解される。

【0089】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2もしくは配列番号4に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはC l o a k e d - 2 ポリペプチド改変体は、ヒトI g GのF c領域の1つ以上のドメインに融合される。抗体は、2つの機能的に独立した部分（「F a b」として公知の変域ドメイン（抗原に結合する）および「F c」として公知の定常ドメイン（食細胞による攻撃および補体

活性化のようなエフェクター機能に関係する)を含む。Fcは、長い血清半減期を有し、一方、Fabは短寿命である(Caponら、Nature、337:525-31(1989))。治療タンパク質と一緒に構築される場合、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテインA結合、補体固定およびおそらく胎盤輸送のような機能を組み込み得る(同書)。表IIは、当該分野で公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

【0090】

【表2】

表II 治療タンパク質とのFc融合物			
Fcの形態	融合パートナー	治療の影響	参考文献
IgG1	CD30-LのN末端	ホジキン病; 未分化リンパ腫; T細胞白血病	米国特許第 5,480,981号
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症; 移植片拒絶	Zheng S., 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisher S., 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee S., 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, またはIgE (最初のドメインを除く)	TNFレセプター	炎症; 自己免疫障害	米国特許第 5,808,029 (1999年9月15日公開)
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Capon S., 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2のN末端	抗癌、抗ウイルス	Harvill S., 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症; 骨密度	WO 97/23614 1997年7月3日公開
IgG1	レクチンのN末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, 1997年12月11日公開
ヒト IgGγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

一つの例において、ヒトIgGヒンジ領域、CH2およびCH3領域の全てまたは一部は、当業者に公知の方法を使用してCloaked-2ポリペプチドのN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。得られるCloaked-2融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって精製され得る。Fc領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、融合されていない対応物よりもインビボで実質的に長い半減期を示すことが見出された。また、Fc

領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化 / 多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または特定の質（例えば、治療的質、循環時間、凝集の減少など）を改善するために変更され得る。

【0091】

関連する核酸分子およびペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 編, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., およびGriffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. およびDevereux, J. 編, M. Stockton Press, New York, 1991; ならびにCarillo 編, SIAM J. Applied Math., 48: 1073, (1988) に記載される方法。

【0092】

同一性および / または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間に最も大きな一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムに記載される。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：GCGプログラムパッケージ (GAP (Devereuxら, Nucl. Acid. Res., 12: 387, (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を

含む)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschulら, J. Mol. Biol., 215:403-410, (1990))。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information(NCBI)および他の供給源(BLAST Manual, Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschulら, 上記)から公に入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた同一性を決定するために使用され得る。

【0093】

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

【0094】

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

Structure、第5巻、補遺3、(1978) ; BLOSUM62比較マトリクスについてHenikoffら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89:10915-10919(1992))もまたアルゴリズムによって使用される。

【0095】

ポリペプチド配列の比較に好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：

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

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

ギャップペナルティー (Gap Penalty) : 12

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

類似性の閾値 : 0。

【0096】

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

【0097】

核酸分子配列比較についての好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：

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

比較マトリクス : 一致 = +10、不一致 = 0

ギャップペナルティー : 50

ギャップレングスペナルティー : 3。

【0098】

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

【0099】

他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較マトリクス、同一性の閾値などが当業者によって使用され得、これには、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む。なされる特定の選択は、当業者に明らかであり、なされる特定の比較（例えば、DNA - DNA間、タンパク質 - タンパク質間、タンパク質 - DNA間）；さらに、比較が所定の配列の対間である（この場合、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）か、一つの配列と配列の大きなデータベースとの間（この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい）であるか）に依存する。

【0100】

（合成）

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

【0101】

（核酸分子）

核酸分子は、Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、種々の方法（化学合成、cDNAまたはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニングおよび/またはcDNAのPCR増幅を含むがこれらに限定されない）で容易に得られ得る。

【0102】

本明細書中で使用される組換えDNA方法は、一般的に、Sambrookら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)）および/またはAusubelら編（Current Protocols in Mol

ecular Biology, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, NY (1994)) に記載される方法である。本発明は、本明細書中に記載される核酸分子およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【0103】

Cloaked - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子がこれらの種から同定された場合、その遺伝子の全てまたは一部は、同じ種からのオルソログ遺伝子または関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用され得る。プローブまたはプライマーは、Cloaked - 2 ポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。さらに、配列番号 1 または配列番号 3 に記載される配列を有する核酸分子の一部または全てを使用してゲノムライブラリーをスクリーニングし、Cloaked - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的には、中程度または高いストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されてスクリーニングから得られた偽陽性の数を最小にする。

【0104】

Cloaked - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現クローニング（これは、発現されたタンパク質の性質に基づく陽性クローンの検出を使用する）によって同定され得る。代表的には、核酸ライブラリーは、宿主細胞表面において発現されそして示されるクローン化タンパク質への抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）の結合によってスクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、検出可能な標識を用いて修飾されて所望のクローンを発現するそれらの細胞を同定する。

【0105】

以下に記載される説明に従って行われる組換え発現技術は、これらのポリヌクレオチドを生成し、そしてコードされるポリペプチドを発現するために、続いて行なわれ得る。例えば、Cloaked - 2 ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、大量の所

望のヌクレオチド配列を容易に作製し得る。次いで、この配列を使用して検出プローブまたは増幅プライマーを作製し得る。あるいは、Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされるCloaked-2ポリペプチドは、大量に生成され得る。

【0106】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。この方法において、cDNAは、逆転写酵素を使用してポリ(A)⁺RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー(代表的には、Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNA(オリゴヌクレオチド)の2つの別の領域に相補的である)を、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにcDNAに加え、そしてポリメラーゼは、2つのプライマー間のcDNA領域を増幅する。

【0107】

Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、Angew.Chem.Intl.Ed.28:716-734(1989)によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが一緒に連結されて、Cloaked-2ポリペプチドの全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATGを有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、Cloaked-2ポリペプチドの

成熟形態で存在してもよいし、そうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0108】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるCloaked-2ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択されるCloaked-2ポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先性のための「Ecohigh.Cod」のようなコドン度数表を組み込んだコンピュータアルゴリズムが使用され得、そしてこれはUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI)によって提供される。他の有用なコドン度数表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod」が挙げられる。

【0109】

（ベクターおよび宿主細胞）

Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入し得る。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じるように、宿主細胞機構と適合性である）。Cloaked-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、Cloaked-2ポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および/またはホスホリル化）されるか否かに一部依存する。

そうである場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth. Enz., v. 185、D. V. Goeddel編, Academic Press Inc., San Diego CA (1990)を参照のこと。

【0110】

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

【0111】

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

【0112】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、Cloaked-2ポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0113】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、Cloaked-2遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【0114】

隣接配列の全てもしくは一部のみが既知である場合、PCRを使用して、そして／または適切なオリゴヌクレオチドおよび／もしくは同じもしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が既知でない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子を含み得る大きな片のDNAから単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatsworth, CA）、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0115】

複製起点は、代表的に、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数に対するベクターの増幅は、いくつかの場合において、Cloaked-2ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、既知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322（製品番号303-3s、New England Biolabs, Beverly, MA）からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターを必要とされない（例えば、SV40起点は、初期プロモーターを含むという理由だけで、しばしば、使用される）。

【0116】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に配置され、そして転写を終結させる働きをする。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、続いてポリT配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化されるか、またはベクターの一部として市販されるが、これはまた、本明細書中上記のような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0117】

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

リン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0118】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生のために大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の連続的な世代の染色体においてタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように独特に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子と Cloaked - 2 ポリペプチドをコードする DNA との両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量の Cloaked - 2 ポリペプチドが、増幅された DNA から合成される。

【0119】

リボソーム結合部位は、通常、mRNA の翻訳開始に必要であり、そして Shine - Dalgarno 配列 (原核生物) または Kozak 配列 (真核生物) によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるべき Cloaked - 2 ポリペプチドのプロモーターの 3' 側およびコード配列の 5' 側に配置される。Shine - Dalgarno 配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン (すなわち、高い A - G 含有量) である。多くの Shine - Dalgarno 配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して、原核生物ベクターを使用して容易に合成され得る。

【0120】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞から Cloaked - 2 ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、Cloaked - 2 核酸分子のコード領域に位置するか、または直接 Cloaked - 2 ポリペプチドコード領域の 5' 側に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能性で

あるいはいずれかのシグナル配列が、C l o a k e d - 2 核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、C l o a k e d - 2 遺伝子またはc D N A に対して同種（天然）または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。多くの場合、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からのC l o a k e d - 2 ポリペプチドの分泌は、分泌されたC l o a k e d - 2 ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入されたC l o a k e d - 2 核酸分子の一部であり得る。

【0121】

C l o a k e d - 2 ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなC l o a k e d - 2 ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列またはC l o a k e d - 2 ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が本発明に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなC l o a k e d - 2 ポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセスしない原核生物宿主細胞のために、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシンI I リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、ネイティブなC l o a k e d - 2 ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、 α 因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列が十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0122】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいようないくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列（p r e s e q u e n c e）が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプレ配列を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最終のタンパク質産物は、- 1 位に（成熟タンパク質の最初

のアミノ酸に対して)、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終のタンパク質産物は、N末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域を切断する場合、所望のCloaked-2ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

【0123】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、Cloaked-2遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない（大部分のcDNAについて）場合、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびCloaked-2遺伝子に関してイントロンの位置は、イントロンが効果的に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、Cloaked-2 cDNA分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側で、ポリA転写終止配列の5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を妨害しないように、cDNAの1つの側または他の側（すなわち、5'側または3'側）に配置される。任意の供給源（任意のウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまた本明細書に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

【0124】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、Cloaked-2ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターをそれぞれ含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般的に、約100～1000bp内）の開始コドン

に対して上流（すなわち、5'側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、通常、2つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）のうちの1つにグループ分けされる。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答してそれらの制御下で、DNAからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対して遺伝子をほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、Cloaked-2ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなCloaked-2遺伝子プロモーター配列は、Cloaked-2核酸分子の増幅および/または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能である場合、および使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

【0125】

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

【0126】

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

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

【0127】

Cloaked-2 遺伝子発現を制御する際に関心があり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40 初期プロモータ領域 (Bernois と Chabbon, Nature 290:304-10, 1981)；CMV プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの 3' 側の長い末端反復に含まれるプロモーター (Yamamoto ら, Cell 22:787-97, 1980)；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1444-1445, 1981)；メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster ら, Nature 296:39-42, 1982)； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villa-Kamaroff ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731, 1978)；または tac プロモーター (DeBoer ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25, 1983)。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている以下の動物転写制御領域もまた関心がある：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼ I 遺伝子制御領域 (Swift ら, Cell 38:639-646, 1984；Ornitz ら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986)；MacDonald, Hepatology 7:425-515, 1987)；膵臓 β 細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域 (Hanahan, Nature 315:115-122, 1985)；リンパ球において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl ら, Cell 38:647-658 (1984)；Adames ら, Nature 318:533-538 (1985)；Alexander ら Mol.

Cell . Biol .、7:1436-1444、1987) ; 精巢、乳房、リンパ球、および肥満細胞において活性なマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域 (Lederら、Cell 45:485-495、1986) ; 肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkertら、Genes and Devel . 1:268-276、1987) ; 肝臓において活性な α -フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlaufら、Mol . Cell . Biol .、5:1639-1648、1985 ; Hammerら、Science 235:53-58、1987) ; 肝臓において活性な α 1-抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら、Genes and Devel . 1:161-171、1987) ; 骨髄性細胞において活性な β -グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら、Nature 315:338-340、1985 ; KolliasらCell 46:89-94、1986、) ; 脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら、Cell 48:703-712、1987) ; 骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域 (Sani、Nature 314:283-286、1985) ; ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら、Science 234:1372-1378、1986) 。

【0128】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明のCloaked-2ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用エレメントである。エンハンサーは、相対的な方向および位置に依存しない。これらは、転写単位に対して5'側および3'側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である(例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインシュリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化に対する例示的な増強エレメン

トである。エンハンサーは、Cloaked-2核酸分子に対して5'位または3'位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'位側に配置される。

【0129】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような出発ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望の隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。1つ以上の所望の隣接配列がすでにベクター内にない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。それぞれの隣接配列を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0130】

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

【0131】

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

、TOPOTM TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA) のようなプラスミド、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはバキュロウイルス発現系のようなウイルスベクター (pBacPAK プラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA) が挙げられる。

【0132】

ベクターが構築され、そしてCloaked-2ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。Cloaked-2ポリペプチドについての発現ベクターを、選択された宿主細胞へ形質転換することは、以下を含む周知の方法によって達成され得る：例えば、トランスフェクション法、感染法、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、またはDEAE-デキストラン法あるいは他の公知の方法。選択された方法は、部分的に、使用される宿主細胞の型の相関的要素である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、そしてこれらは、例えば、Sambrookら(前出)に示されている。

【0133】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞(例えば、E. coli)であっても、真核生物宿主細胞(例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞)であってもよい。宿主細胞は、適切な条件下で培養された場合、Cloaked-2ポリペプチドを合成し、これは、引き続き、培養培地から収集され得る(宿主細胞がこれを培地に分泌する場合)か、またはこれを産生する宿主細胞から直接収集され得る(これが分泌されない場合)。適切な宿主細胞の選択は、種々の因子(例えば、所望の発現レベル、活性に望ましいかもしくは必要とされるポリペプチド修飾(例えば、グリコシル化またはリン酸化)、および生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さ)に依存する。

【0134】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection(ATCC), 108

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

【0135】

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

【0136】

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

【0137】

さらに、所望される場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら、*Biotechniques*, 14: 810-17 (1993); Lucklow、*Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 564-572 (1993); および Lucklowら、*J. Virol.*, 67: 4566-4579 (1993) に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9 および Hi5 (Invitrogen、Carlsbad、CA) である。

【0138】

グリコシル化 Cloaked-2 ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳産動物（例えば、雌ウシまたはヤギ）を使用し、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳に得ることができる。Cloaked-2 ポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、しかし、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0139】

（ポリペプチド産生）

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

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

【0140】

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

【0141】

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

【0142】

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

【0143】

宿主細胞細胞質および / または核 (真核生物宿主細胞について) に位置するかあるいは細胞質ゾル (細菌宿主細胞について) に位置する Cloaked - 2 ポ

リペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌について封入体を含む）が、当業者に公知の任意の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および/または超音波処理、それらに続く遠心分離によって、ペリプラズム/細胞質の中身を放出するように溶解され得る。

【0144】

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

【0145】

いくつかの場合、Cloaked-2ポリペプチドは、単離の際、生物学的に活性でなくても良い。「再折り畳みする」、つまり、ポリペプチドをその三次構造に変換し、ジスルフィド連結を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドをあるpH（通常7より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（chaotrope）の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使われ、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み/酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化

形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成においてジスルフィドシャフリングを生成させる。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン/シスタミン、グルタチオン (GSH) / ジチオビスGSH、塩化銅 (II)、ジチオトレイトール (DTT) / ジチアンDTT、および2,2-メルカプトエタノール (bME) / ジチオ-b (ME) が挙げられる。共溶媒が、再折り畳みの効率を増加するために使用され得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【0146】

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

【0147】

溶液からのCloaked-2ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。そのポリペプチドがそのカルボキシル末端もしくはアミノ末端のいずれかに、ヘキサヒスチジンのようなタグを含む (Cloaked-2ポリペプチド/ヘキサHis) かまたはFLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) もしくはmyc (Invitrogen, Carlsbad, CA) のような他の小さいペプチドを含むように合成されている場合、そのポリペプチドは、カラムマトリックスがそのタグに高い親和性を有するアフィニティーカラムにその溶液を通すことによって、本質的に1工程のプロセスで精製され得る。

【0148】

例えば、ポリヒスチジンはニッケルに大きな親和性および特異性で結合し、従ってニッケルのアフィニティーカラム (例えば、Qiagen (登録商標) ニッケルカラム) が、Cloaked-2ポリペプチド/ポリHisの精製に使用され得る。例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、10.11.8節、John W

iley & Sons、New York (1993) を参照のこと。

【0149】

さらに、Cloaked - 2 ポリペプチドは、Cloaked - 2 ポリペプチドを特異的に認識し得るモノクローナル抗体の使用を介して、精製され得る。

【0150】

従って、精製に適切な手順としては、以下が挙げられるが、それらに限定はされない：アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、電気泳動 (ネイティブゲル電気泳動を含む) と続くゲル溶出、ならびに分取等電収束法 (preparative isoelectric focusing) (「Isoprime」マシン/技術、Hoefer Scientific、San Francisco、CA)。いくつかの場合、2 つ以上の精製技術が、純度の増加を達成するために組み合わされ得る。

【0151】

Cloaked - 2 ポリペプチドもまた、当該分野で公知の技術を使用して化学合成法 (例えば、固相ペプチド合成) により調製され得、その公知技術は、たとえば、Merrifieldら (J. Am. Chem. Soc. 85:2149、1963)、Houghtonら (Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132、1985)、ならびにStewartおよびYoung (Solid Phase Peptide Synthesis、Pierce Chemical Co.、Rockford、IL、1984) に示される技術である。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含んで合成され得るか、またはこれを含まずに合成され得る。化学合成されたCloaked - 2 ポリペプチドは、これらの参考文献に示される方法を使用して、ジスルフィド架橋を形成するように酸化され得る。化学合成されたCloaked - 2 ポリペプチドは、組換え産生されるかもしくは天然の供給源から精製された対応するCloaked - 2 ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると予

測され、従って、組換えCloaked-2ポリペプチドもしくは天然のCloaked-2ポリペプチドと互換可能に使用され得る。

【0152】

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

【0153】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、Cloaked-2に対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら、Proc. Natl. Acad. Sci. 94:12297-12303(1997)を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Roberts, R., Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-273(1999)もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、このプールは、それぞれが、5'ランダム化配列、中心予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0154】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的遺伝子またはそのフ

ラグメントを産生し、次いで、宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成され、この細胞によって、確率論的遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生される。次いで、この宿主細胞は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0155】

(化学的誘導体)

C l o a k e d - 2 ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、この開示が、本明細書中以下に記載されると、当業者によって調製され得る。C l o a k e d - 2 ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然で結合した分子の型または位置のいずれかで異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然で結合した化学的な基の除去によって形成される分子を含み得る。配列番号2もしくは配列番号4、またはC l o a k e d - 2 ポリペプチド改変体のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水環境(例えば、生理学的な環境)下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の調製物の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0156】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2 k D aと約100 k D aとの間の平均分子量を有する(この用語「約(およそ)」は、水溶性ポリマーの調製の際に、幾つかの分子が、上記の分子量より多い、いくらか少ない重量を有することを示す)。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5 k D aと約50 k D aの間、より好ましくは、約12 k D aと約40 k D aとの間、そして最も好ましくは、約20 k D aと約35 D aとの間である。

【0157】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N結合型炭水化物またはO結合型炭水化物、糖、リン酸、ポ

リエチレングリコール (P E G) (これは、モノ - (C₁ - C₁₀) アルコキシ - ポリエチレングリコール、またはアリールオキシ - ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用された P E G の形態を含む)、モノメトキシ - ポリエチレングリコール、デキストラン (例えば、低分子量 (例えば、約 6 k D の) デキストラン)、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ - (N - ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、およびビニルアルコール。配列番号 2 もしくは 4、または C l o a k e d - 2 ポリペプチド改変体のアミノ酸配列を含む共有結合したこのポリペプチドのマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【 0 1 5 8 】

一般に、化学的誘導体化は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に以下の工程を包含する： (a) 配列番号 2 もしくは 4、または C l o a k e d - 2 ポリペプチド改変体のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、 1 以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子 (例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体) とポリペプチドを反応させる工程、ならびに (b) 反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子：タンパク質の比が大きくなるほど、結合されるポリマー分子の割合も大きくなる。 1 実施形態において、 C l o a k e d - 2 ポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一ポリマー分子部分を有し得る。例えば、米国特許第 5 , 2 3 4 , 7 8 4 号を参照のこと。

【 0 1 5 9 】

ポリペプチドのペギル化 (p e g y l a t i o n) は、当該分野で公知の任意のペギル化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている： F r a n c i s ら , 1 9 9 2 , F o c u s o n G r o w t h F a c t o r s 3 : 4 - 1 0 ; 欧州特許第 0 1 5 4 3 1

6号；欧州特許第0401384号；ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペギル化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有さなければならない。還元的アルキル化のために、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有さなければならない。例えば、反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであり、これは、水溶性、またはモノC₁-C₁₀アルコキシもしくはそのアリールオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

【0160】

別の実施形態において、Cloaked-2ポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、この連結したビオチン/Cloaked-2ポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、4価のアビジン/ビオチン/Cloaked-2ポリペプチド分子が得られる。Cloaked-2ポリペプチドはまた、ジニトロフェノール(DNP)またはトリニトロフェノール(TNP)に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗-DNPまたは抗-TNP-IgMと共に沈殿し、10価の十量体の結合体を形成する。

【0161】

一般に、本発明のCloaked-2ポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、Cloaked-2ポリペプチドについて本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるCloaked-2ポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強または減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加または減少した半減期）を有し得る。

【0162】

（遺伝子操作された非ヒト動物）

非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、もしくは他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、またはヒツジ、あるいは、他の家畜動物）は、本発明の範囲内にさらに含まれ

る。これらの動物において、ネイティブなC l o a k e d - 2ポリペプチドをコードする遺伝子は、破壊されている（「ノックアウトされている」）ので、これらの遺伝子の発現レベルは、顕著に減少しているかまたは完全に除外されている。このような動物は、例えば、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【0163】

本発明はさらに、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、もしくは他のげっ歯類、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜動物）を含み、これらの動物において、これらの動物に対してネイティブな形態のC l o a k e d - 2遺伝子または異種性C l o a k e d - 2遺伝子は、これらの動物によって過剰発現され、これにより、「トランスジェニック」動物が作製される。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT出願番号WO94/28122に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【0164】

本発明はさらに、非ヒト動物を含み、これらの動物において、本発明の1つ以上のC l o a k e d - 2ポリペプチドについてのプロモーターは、（例えば、異種性組換え法を使用することによって）活性化されるかまたは不活性化されて、1つ以上のネイティブなC l o a k e d - 2ポリペプチドの発現レベルを変更する。

【0165】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングに使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物に対する薬物候補の影響が、測定され得る。例えば、薬物候補は、C l o a k e d - 2遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生されるC l o a k e d - 2ポリペプチドの量は、動物をその薬物候補に暴露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患または病理学的状態に関し得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少させる薬物候補の能力、または病理学的状態を予防もしくは阻害する薬物候補の能力を試験し

得る。他の例としては、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の産生が、疾患または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患または病理学的状態と関連し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少するための薬物候補の能力、または病理学的状態を予防もしくは阻害する薬物候補の能力を試験し得る。

【0166】

（マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイ技術が、本発明に従って利用され得ることは明らかである。DNAマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置された、核酸の微小の高密度アレイである。このアレイ内の各セルまたはエレメントは、単一種のDNAの多くのコピーを有し、このDNAは、その同族のmRNAに対するハイブリダイゼーションのための標的として作用する。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、最初に、mRNAが、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素的に変換される。この材料を、マイクロアレイにハイブリダイズさせ、そして未結合cDNAを洗浄により除去する。次いで、アレイ上に提示される別々の遺伝子の発現を、各標的DNAに特異的に結合された標識cDNAの量を定量することによって可視化する。このようにして、数千の遺伝子の発現を、生物学的材料の単一のサンプルから、高スループットの並行様式で定量し得る。

【0167】

この高スループット発現プロファイリングは、本発明のCloaked-2分子に関する広範な適用を有する。これらの適用としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：治療用標的としてのCloaked-2疾患関連遺伝子の同定および確証；Cloaked-2分子およびそのインヒビターの分子毒生学；集団の層別化および臨床試験用の代理マーカーの作製；ならびに高スループットスクリーニング（HTS）における選択的な化合物の同定を補助することによるCloaked-2関連低分子薬物発見の増大。

【0168】

（選択的結合因子）

本明細書中で用いられる場合、用語「選択的結合因子」は、1以上のC l o a k e d - 2ポリペプチドに対して特異性を有する分子を言及する。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なC l o a k e d - 2ポリペプチド選択的結合因子は、C l o a k e d - 2ポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、ポリペプチドのC l o a k e d - 2ポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。

【0169】

C l o a k e d - 2ポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナル抗体を含むポリクローナル抗体；モノクローナル抗体（MAb）；組換え抗体；キメラ抗体；ヒト化（例えば、CDR移植）抗体；ヒト抗体；単鎖抗体；および/または二特異的抗体；ならびにそれらのフラグメント；改変体；または誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、C L O A K E D - 2ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のこれらの一部を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって産生されたF a bおよびF（a b'）フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現）によって産生されたフラグメントが挙げられる。

【0170】

C l o a k e d - 2ポリペプチドに対して指向されるポリクローナル抗体は、一般に、C l o a k e d - 2ポリペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物（例えば、ウサギまたはマウス）において産生される。C l o a k e d - 2ポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは、有用であり得、このタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターのように、免疫化される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採

血され、そして血清を、抗Cloaked-2ポリペプチド抗体力価についてアッセイする。

【0171】

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

【0172】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。1実施形態は、「キメラ」抗体であり、この重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種から誘導されるかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と、同一であるかまたは相同性である一方で、この鎖の残りは、別の種から誘導されるかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と、同一であるかまたは相同性である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、これらの抗体のフラグメントもまた含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855を参照のこと。

【0173】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト

化抗体は、非ヒトである供給源から導入された1以上のアミノ酸残基有する。ヒト化は、例えば、当該分野で記載される方法(Jonesら、1986、Nature 321:522-525; Riechmannら、1998、Nature 332:323-327; Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-1536)を使用して、鋸状(rodent)相補的決定領域(CDR)の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域と置換することによって、実施され得る。

【0174】

Cloaked-2ポリペプチドに結合するヒト抗体もまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用して、このような抗体は、Cloaked-2抗原(すなわち、少なくとも6個の連続アミノ酸を有する)(必要に応じて、キャリアに結合される)を用いて免疫化することによって産生される。例えば、Jakobovitsら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci., 90:2551-2555; Jakobovitsら、1993、Nature 362:255-258; Bruggermannら、1993、Year in Immuno., 7:33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、本明細書中の重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖タンパク質および軽鎖タンパク質をコードする内因性遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物(この動物は、改変体の完全相補体未満を有する)は、全ての所望の免疫系の改変体を有する動物を得るためにクロスブレッドされる。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト(例えば、マウス以外)アミノ酸配列(このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である改変領域を含む)を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US91/245およびPCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1

号および同第546073A1号に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中の組換えDNAの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0175】

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

【0176】

キメラ抗体、CDR移植抗体、およびヒト化抗体は、代表的に、組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される材料および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞(例えば、CHO細胞)中で産生される。モノクローナル(例えば、ヒト)抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0177】

本発明の抗-Cloaked-2抗体は、Cloaked-2ポリペプチドの検出および定量のために、任意の公知のアッセイ方法(例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ)において使用され得る(Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158頁(CRC Press, Inc., 1987))。これらの抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性でCloaked-2ポリペプチドに結合する。

【0178】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗 - C l o a k e d - 2 抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、この検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{125}I ）、蛍光化合物もしくは化学的蛍光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 β - ガラクトシダーゼ、もしくは西洋わさびペルオキシダーゼ）であり得る（Bayerら，1990，Meth．Enz．，184：138 - 163）。

【0179】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、C l o a k e d - 2 ポリペプチド、またはその免疫学的に反応性の部分）の能力に依存し、限定された量の抗 - C l o a k e d - 2 抗体との結合に関して、試験サンプル検体（C l o a k e d - 2 ポリペプチド）と競合する。試験サンプル中のC l o a k e d - 2 ポリペプチドの量は、抗体に結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、競合前または後に、代表的に不溶化され、その結果、この抗体に結合する標準および検体は、結合しないままの標準および検体から好都合に分離され得る。

【0180】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用を代表的に含み、各々は、検出および/または定量される予定のタンパク質の異なる免疫原部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル検体は、固体支持体上に固定された第1抗体によって代表的に結合され、その後、第2抗体が、この検体に結合され、このようにして不可溶性の3部の複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110を参照のこと。第2抗体は、検出可能な部分でそれ自体標識されるか（直接的なサンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識される抗免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る（間接的なサンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イ

ムノソルベント検定法 (E L I S A) (この場合、検出可能な部分は、酵素である) である。

【 0 1 8 1 】

抗 C l o a k e d - 2 抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボでの画像化に有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物、好ましくは血流に投与され得、そして宿主中の標識された抗体の存在および位置が、アッセイされる。抗体は、核磁気共鳴、放射線医学、または当該分野において公知の他の検出手段のもいづれかによるかに関わらず、動物中で検出可能な任意の部分で標識され得る。

【 0 1 8 2 】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、C l o a k e d - 2 ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかであるという点で、アゴニストまたはアンタゴニストである。1実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、C l o a k e d - 2 ポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでC l o a k e d - 2 ポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子 (例えば、アンタゴニスト抗体) は、少なくとも約50%、および好ましくは、少なくとも約80%だけ、C l o a k e d - 2 ポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、C l o a k e d - 2 結合パートナー (リガンドまたはレセプター) と相互作用し得る抗体であり得、これにより、インビトロまたはインビボにおいてC l o a k e d - 2 活性を阻害または排除する。アゴニストおよびアンタゴニストの抗 - C l o a k e d - 2 抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

【 0 1 8 3 】

本発明はまた、生物学的サンプル中のC l o a k e d - 2 選択結合因子 (例えば、抗体) およびC l o a k e d - 2 ポリペプチドのレベルを検出するために有用な他の試薬を含むキットに関する。このような試薬は、検出可能な標識、プロ

ッキング血清、ポジティブコントロールサンプルおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬を含み得る。

【0184】

本発明のCloaked-2ポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを用いてCloaked-2レセプターをクローニングするために使用され得る。放射性標識された(125-ヨウ素)Cloaked-2ポリペプチドまたはアフィニティ/活性タグ化Cloaked-2ポリペプチド(例えば、Fc融合物またはアルカリホスファターゼ融合物)は、Cloaked-2レセプターを発現する細胞型、細胞株または組織を同定するための結合アッセイにおいて使用され得る。このような細胞または組織から単離されたRNAは、cDNAに変換され得、哺乳動物発現ベクターにクローニングされ得、そして発現ライブラリーを作製するために哺乳動物細胞(例えば、COSまたは293細胞)にトランスフェクトされ得る。次いで、放射標識されたかまたはタグ化されたCloaked-2ポリペプチドを、アフィニティ試薬として使用して、Cloaked-2レセプターをその表面上で発現する細胞のサブセットを同定し、そしてこのライブラリーから単離し得る。次いで、DNAは、これらの細胞から単離され得、そして二次的発現ライブラリーを作製するために哺乳動物細胞にトランスフェクトされる。このライブラリーにおいて、Cloaked-2レセプターを発現する細胞の画分は、もともとのライブラリーにおけるものよりも数倍高い。この濃縮プロセスは、Cloaked-2レセプターを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、反復(repeated iteratively)され得る。Cloaked-2レセプターの単離は、Cloaked-2ポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストを同定および開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストは、可溶性Cloaked-2レセプター、抗Cloaked-2レセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、そしてそれらは、本明細書中で記載される疾患または障害を含む、1つ以上の疾患または障害を処置、予防または診断するために使用され得る。

【0185】

(Cloaked - 2 ポリペプチド活性の他の調節因子についてのアッセイ)
いくつかの状況において、Cloaked - 2 ポリペプチドの活性の調節因子 (すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト) である分子を同定することが所望され得る。Cloaked - 2 ポリペプチドを調節する天然分子または合成分子は、本明細書中に記載されるもののような1つ以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、エキソビグ様式で、または注入によるインビグ様式で、あるいは経口送達、移植デバイスなどのいずれかで投与され得る。

【0186】

「試験分子」は、Cloaked - 2 ポリペプチドの活性を調節 (すなわち、増加または減少) する能力についての評価の下にある分子をいう。最も一般的には、試験分子は、Cloaked - 2 ポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまたCloaked - 2 ポリペプチド活性を、例えば、Cloaked - 2 遺伝子発現に影響を与えることによってか、またはCloaked - 2 結合パートナー (例えば、レセプターまたはリガンド) に結合することによって、間接的に調節し得ることも意図される。1つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは約 10^{-8} M、より好ましくは約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数でCloaked - 2 ポリペプチドに結合する。

【0187】

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

【0188】

特定の実施形態において、Cloaked - 2 ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の

分子であり得、これは、C l o a k e d - 2 ポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する。C l o a k e d - 2 ポリペプチドの発現を調節する分子は、C l o a k e d - 2 ポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、またはC l o a k e d - 2 ポリペプチドの発現を指向もしくは制御する核酸配列に対して相補的である核酸分子、および発現のアンチセンス調節因子として作用する核酸分子を含む。

【0189】

一旦、1セットの試験分子がC l o a k e d - 2 ポリペプチドと相互作用するとして同定されると、この分子は、C l o a k e d - 2 ポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とC l o a k e d - 2 ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの様式で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、C l o a k e d - 2 ポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてC l o a k e d - 2 ポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。

【0190】

試験分子とC l o a k e d - 2 ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むC l o a k e d - 2 ポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0191】

C l o a k e d - 2 ポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのC l o a k e d - 2 ポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対するC l o a k e d - 2 ポリペプチドの結合の速度および/または程度を増加または減少させるその能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのア

ッセイにおいて、C l o a k e d - 2 ポリペプチドは、マイクロタイタープレートウェル中で固定される。次いで、放射標識したC l o a k e d - 2 結合パートナー（例えば、ヨウ素化したC l o a k e d - 2 結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、1 つずつ（いずれかの順序で）または同時にのいずれかで添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射活性を計数し、結合パートナーがC l o a k e d - 2 ポリペプチドに結合する程度を決定する。代表的に、分子は、ある濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1 以上のエレメントを欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対してC l o a k e d - 2 結合パートナーを固定し、試験分子および放射標識したC l o a k e d - 2 ポリペプチドと共にインキュベートし、そしてC l o a k e d - 2 ポリペプチド結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、J o h n W i l e y & S o n s , N e w Y o r k (1 9 9 5) を参照のこと。

【0192】

放射性標識に対する代替として、C l o a k e d - 2 ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P ）またはアルカリホスファターゼ（A P ））（これらは、比色定量的に検出される）に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。C l o a k e d - 2 ポリペプチドまたはC l o a k e d - 2 結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体もまた使用されそして、A P またはH R P に連結した酵素連結ストレプトアビジンとのインキュベーションの後に検出され得る。

【0193】

C l o a k e d - 2 ポリペプチドまたはC l o a k e d - 2 結合パートナーは、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定され得る。基材 - タンパク質複合体は、相補タンパク

質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そしてC l o a k e d - 2 ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材 - タンパク質複合体は、カラム内に固定され得、試験分子および相補タンパク質はカラムを通される。C l o a k e d - 2 ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（すなわち、放射性標識または抗体結合など）のいずれかを使用して評価され得る。

【0194】

C l o a k e d - 2 ポリペプチドとC l o a k e d - 2 結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、B I A c o r e アッセイシステム（P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N J ））である。B I A c o r e システムは、製造業者のプロトコルを使用して行われ得る。このアッセイは、本質的に、C l o a k e d - 2 ポリペプチドまたはC l o a k e d - 2 結合パートナーのいずれかの、デキストランコーティングセンサーチップ（これは、検出器に存在する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側に物理的に関係する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定され得る。

【0195】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、C l o a k e d - 2 ポリペプチドとC l o a k e d - 2 結合パートナーと複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に

記載される。

【0196】

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

【0197】

Cloaked-2ポリペプチドとCloaked-2結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる化合物はまた、Cloaked-2ポリペプチドまたはCloaked-2結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌまたはげっ歯類の供給源由来である。Cloaked-2ポリペプチドの、Cloaked-2結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験分子の存在下または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、Cloaked-2結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0198】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、Cloaked-2遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるCloaked-2ポリペプチドの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実際の影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養

物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメントなど）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

【0199】

（内部移行タンパク質）

t a t タンパク質配列（H I V由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、F a l w e l l ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , 91:664-68(1994)を参照のこと。例えば、H I V t a t タンパク質の11アミノ酸の配列（Y G R K K R R Q R R R ; 配列番号23）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはT A T P D Tを称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。S c h w a r z e ら、S c i e n c e 285:1569-72(1999) ; およびN a g a h a r a ら、N a t u r e M e d i c i n e 4:1449-1452(1998)を参照のこと。これらの手順において、F I T C 構築物（F I T C - G G G G Y G R K K R R Q R R R ; 配列番号24）（これは、腹腔内投与に続いて組織を貫通する）が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光細胞分析分離（F A C S）分析によって検出される。次いでt a t - β - g a l 融合タンパク質が構築される。この構築物で処置された細胞は、 β - g a l 活性を示した。注入に続いて、これらの手順を使用して、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織を含む）が、発現を示すことが見出された。これらの構築は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入に続いて、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0200】

従って、t a t タンパク質配列は、所望のタンパク質またはポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、t a t タンパク質配列を使用して、C l o a k e d - 2 アンタゴニスト（例えば、抗C l o a k e d - 2 選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンス

オリゴヌクレオチド)は、Cloaked-2分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「Cloaked-2分子」は、本明細書中に記載されるような、Cloaked-2核酸分子およびCloaked-2ポリペプチドの両方をいう。所望ならば、Cloaked-2タンパク質自体はまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus, E, 「Introducing Proteins into the Body's Cells」、Science 285:1466-1467 (1999)をまた参照のこと。

【0201】

(治療用途)

シスチン-ノット成長因子の構造のメンバーは、以下の1つ以上の生物学的プロセスの重要な調節因子である：細胞増殖、細胞生存、細胞分化、細胞間連絡および細胞機能。例えば、SunおよびDavies, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, vol. 24, 269-291頁(1995)を参照のこと。

【0202】

本発明のポリペプチドおよび核酸を用いて、処置、診断、寛解または予防し得る、急性および慢性疾患の非排他的な列挙は、以下を含む：

- ・腎臓に関する疾患または障害。このような疾患または障害の例としては、貧血、高血圧および低血圧が挙げられるが、これらに限定されない。他の腎臓に関連する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0203】

- ・心臓に関する疾患または障害。このような疾患または障害の例としては、心臓肥大、うっ血性心不全、心筋梗塞、不整脈、アテローム性動脈硬化症、高血圧および低血圧が挙げられるが、これらに限定されない。他の心臓に関連する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0204】

- ・骨格筋に関する疾患または障害。このような疾患または障害の例としては、筋ジストロフィーおよび悪液質が挙げられるが、これらに限定されない。他の骨

格筋に関連する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0205】

・胎盤に関する疾患または障害。このような疾患または障害の例としては、流産および先天性奇形が挙げられるが、これらに限定されない。他の胎盤に関連する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0206】

・肝臓に関する疾患または障害。このような疾患または障害の例としては、肝炎および肝硬変が挙げられるが、これらに限定されない。他の肝臓に関連する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0207】

・膵臓に関する疾患または障害。このような疾患または障害の例としては、糖尿病および膵臓炎が挙げられるが、これらに限定されない。他の肝臓に関連する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0208】

・甲状腺に関する疾患または障害。このような疾患または障害の例としては、グレーヴズ病および粘液水腫が挙げられるが、これらに限定されない。他の甲状腺に関連する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0209】

・副腎皮質に関する疾患または障害。このような疾患または障害の例としては、クッシング病およびアディソン病が挙げられるが、これらに限定されない。他の副腎皮質に関連する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0210】

さらに、腎臓、心臓、胎盤、骨格筋、肝臓、膵臓、甲状腺および副腎皮質におけるCloaked-2の発現は、これらの器官または組織の共通の機能（すなわち、エネルギー利用／恒常性および代謝）におけるCloaked-2の潜在的役割を示す。このように、Cloaked-2ポリペプチドおよび／またはCloaked-2ポリペプチドアゴニストもしくはアンタゴニスト（例えば、選択的結合因子）は、エネルギー利用／恒常性の疾患または障害および代謝疾患または障害の処置およびまたは診断のために有用であり得る。このような疾患また

は障害としては、肥満、るいそう症候群（例えば、癌関連の悪液質）、ミオパシー、胃腸疾患または障害、糖尿病、成長不全、高コレステロール血症、アテローム性動脈硬化症または老化が挙げられるがこれらに限定されない。他のエネルギー利用／恒常性および代謝関連の疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0211】

脳におけるCloaked-2の発現は、特に、扁桃および視床において検出される。脳のこれらの領域の両方は、意識的感覚からの情報を処理および中継することに関する大脳辺縁系の構成成分である。扁桃における病変は、従順な行動、情緒不安定、闘争性増大および食欲増進を引き起こす。このように、Cloaked-2ポリペプチドおよび／またはCloaked-2ポリペプチドアゴニストもしくはアンタゴニストは、情緒に関する疾患または障害の処置および／または診断に有用であり得る。このような疾患または障害の例としては、うつ病、肥満、強迫性障害、精神病、不安、精神分裂病、双極性障害およびストレスに関する疾患または障害が挙げられるが、これらに限定されない。他の情緒に関する疾患または障害は、本発明の局面に含まれる。

【0212】

Cloaked-2ポリペプチドはまた、腎臓、心臓、胎盤、骨格筋、肝臓、脾臓、甲状腺、副腎皮質、扁桃および視床に存在する組織または特定の細胞型の再生（増殖および分化）に関する成長因子として機能し得る。

【0213】

Cloaked-2ポリペプチドは、ホルモン活性また成長因子活性を有しているようであるので、Cloaked-2ポリペプチドおよび／またはCloaked-2ポリペプチドアゴニストもしくはアンタゴニストは、細胞増殖および／または分化の増大によって処置され得る疾患または障害の、処置および／または診断に有用であり得る。このような疾患または障害の例としては、（例えば、癌処置、感染、自己免疫疾患または障害に起因する）組織損傷／変性、老化および創傷治癒が挙げられるがこれらに限定されない。細胞増殖および／または分化の増大によって処置され得る他の疾患または障害はまた、本発明の一部である治療的有用性および診断的有用性に含まれる。

【0214】

Cloaked - 2 ポリペプチドは、ホルモン活性また成長因子活性を有しているようであるので、Cloaked - 2 ポリペプチドおよび/またはCloaked - 2 ポリペプチドアゴニストもしくはアンタゴニストは、細胞増殖および/または分化の減少によって処置され得る疾患または障害の、処置および/または診断に有用であり得る。このような疾患または障害の例は、癌、過形成および肥大が挙げられるがこれらに限定されない。細胞増殖および/または分化の減少によって処置され得る他の疾患または障害はまた、本発明の一部である治療的有用性および診断的有用性に含まれる。

【0215】

望ましくないレベルのCloaked - 2 ポリペプチドに起因するかまたは媒介される他の疾患または障害は、本発明の一部である治療有用性および診断有用性に含まれる。例示の目的で、このような望ましくないレベルとしては、過度に上昇したレベルおよび正常以下のレベルが挙げられる。

【0216】

(Cloaked - 2 組成物および投与)

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

【0217】

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

【0218】

薬学的組成物は、例えば、pH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、において、無菌性、安定性、溶解または放出の速度、吸着、または組成物の浸透を改変、

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

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、Cloaked-2分子の物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0220】

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

【0221】

このCloaked-2の薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達(例えば、経口的)のために選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術の範囲内にある。

【0222】

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

【0223】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクル中に所望のCloaked-2分子を含む、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、Cloaked-2分子は、滅菌の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物としては、その産物の制御された放出または持続された放出（徐放）を提供する、注射可能なミクロスフェア、生分解性（bio-erodible）粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸）、またはビーズ、またはリポソームのような因子と、所望の分子との処方物が挙げられ得、これは、次いで、蓄積注射を介して送達され得る。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環中の持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段としては、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

【0224】

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

【0225】

特定の処方物が、経口投与され得ることもまた意図される。本発明の1つの実施形態において、この様式で投与されるCloaked-2分子は、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるこれらのキャリアを伴うかまたは伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化されそして前全身性分解（pre-systemic degradation）が最小化される場合、胃腸管内にある時点でその処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、Cloaked

- 2分子の吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、香料、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた使用され得る。

【0226】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のCloaked-2分子を含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、またはリン酸カルシウム）；あるいは結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア）；あるいは滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

【0227】

さらなるCloaked-2の薬学的組成物は、当業者に明らかであり、これらには、持続送達処方物または制御送達処方物中にCloaked-2ポリペプチドを含む処方物が挙げられる。種々の他の持続送達手段または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生分解性微粒子もしくは多孔性ビーズ）の処方および蓄積注射のための技術もまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US 93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性微粒子の制御された放出を記載する）を参照のこと。徐放性調製物のさらなる例としては、成形品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリクスが挙げられる。徐放性マトリクスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP 58,481）、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ら, Biopolymers 22:547-56, (1983)）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langerら, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, (1981)およびLanger, Chem. Tech. 12:98-105, (1982)）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（EP 133,988号）が挙げられ得る。徐放性組成物はまた、

リボソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、E p p s t e i n ら, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 82:3688-3692, (1985); E P 36, 676号; E P 88, 046号; E P 143, 949号を参照のこと。

【0228】

インビボ投与のために使用されるC l o a k e d - 2の薬学的組成物は、代表的に、滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、これらの方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前後のいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液中で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアル）内に配置される。

【0229】

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

【0230】

特定の実施形態において、本発明は、単回投与の投与単位を生成するためのキットに関する。これらのキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を備え得る。単一チャンバおよびマルチチャンバの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（l y o s y r i n g e））を備えるキットもまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0231】

治療的に使用されるC l o a k e d - 2の薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。従って、処置のための適切な投薬レベルが、

送達される分子、Cloaked-2分子が使用される指標、投与の経路、ならびに患者のサイズ（体重、体表面、または器官のサイズ）および患者の状態（年齢および全身的な健康状態）に部分的に依存して変化することが、当業者に理解される。従って、臨床家は、最適な治療効果を得るために、投薬量を滴定（titer）し得、そして投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ までまたはそれを超える範囲にあり得る。他の実施形態において、投薬量は、 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ まで；または $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ まで；または $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ までの範囲にあり得る。

【0232】

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

【0233】

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

【0234】

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

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

【0235】

いくつかの場合において、エキソビボ様式において、Cloaked-2ポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から取り出された細胞、組織または器官は、Cloaked-2の薬学的組成物に曝露され、その後これらの細胞、組織、および/または器官は続いて患者に移植し戻される。

【0236】

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

【0237】

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

【0238】

相同組換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または矯正するよう

に遺伝子を標的化するために元々開発された技術である (Kucherlapot i, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol., 36:301, 1989)。この基本的技術は、特定の変異を、哺乳動物ゲノムの特定の領域へ導入するための方法として (Thomasら, Cell, 44:419-428, 1986; ThomasおよびCapecchi, Cell, 51:503-512, 1987; Doetschmanら, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:8583-8587, 1988)、または欠損遺伝子内の特定の変異を矯正するための方法として (Doetschmanら, Nature, 330:576-578, 1987) 開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号、EP 913051、欧州公開番号第505500号; PCT/US90/07642、国際公開番号 WO 91/09955に記載される。

【0239】

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

【0240】

Cloaked-2ポリペプチドと相互作用し得るかまたはCloaked-2ポリペプチドの発現を制御し得るDNA領域(例えば、隣接配列)が、標的化DNAのこれらの小片に結合される。例えば、プロモーター/エンハンサーエレ

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

【0241】

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

【0242】

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

【0243】

相同組換えを用いて、細胞の内因性C l o a k e d - 2 遺伝子からのC l o a k e d - 2 ポリペプチド産生を増大させ得るかまたは生じさせ得る1つの方法は、第1に、相同組換えを用いて部位特異的組換え系（例えば、C r e / l o x P 、 F L P / F R T ）（S a u e r , C u r r e n t O p i n i o n I n B i o t e c h n o l o g y , 5 : 5 2 1 - 5 2 7 , 1 9 9 4 ; およびS a u e r , M e t h o d s I n E n z y m o l o g y , 2 2 5 : 8 9 0 - 9 0 0 , 1 9 9 3 ）由来の組換え配列を、細胞の内因性ゲノムC l o a k e d - 2 ポリペプチドコード領域の上流に（すなわち、5'側に）配置することを含む。ゲノムC l o a k e d - 2 ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に相同な組換え部位を含むプラスミドは、この改変された細胞株に、適切なリコンビナーゼ酵素と共に導入される。このリコンビナーゼ酵素は、このプラスミドを、プラスミドの組換え部位を介して、その細胞株におけるゲノムC l o a k e d - 2 ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込ませる（B a u b o n i s およびS a u e r , N u c l e i c A c i d s R e s . , 2 1 : 2 0 2 5 - 2 0 2 9 , 1 9 9 3 ; およびO ' G o r m a n ら , S c i e n c e , 2 5 1 : 1 3 5 1 - 1 3 5 5 , 1 9 9 1 ）。転写を増大させることが公知の任意の隣接配列（例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド内に適切に配置された場合に、新たな転写単位または改変された転写単位を作製するような様式で組み込み、この細胞の内因性C l o a k e d - 2 遺伝子からのデノボC l o a k e d - 2 ポリペプチド産生または増大したC l o a k e d - 2 ポリペプチド産生を生じる。

【0244】

部位特異的な組換え配列がその細胞の内因性ゲノムC l o a k e d - 2 ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するためのさらなる方法は、相同組換えを使用して、第2の組換え部位を、この細胞株のゲノムの他の箇所に導入することである。次いで、適切なリコンビナーゼ酵素が、この2つの組換え部位の細胞株に導入されて、これが、組換え事象（欠失、反転、転移）を引き起こす（S a u e r , C u r r e n t O p i n i o n I n B i o t e c

hnology, 前出, 1994; Sauer, Methods In Enzymology, 前出, 1993)。この組換え事象は、新たな転写単位または改変された転写単位を作製し、この転写単位が、この細胞の内因性Cloaked-2遺伝子からのデノボCloaked-2ポリペプチド産生または増加したCloaked-2ポリペプチド産生を生じる。

【0245】

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

【0246】

本発明は、さらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。特定の実施形態において、例示的なDNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列；（b）調節配列；（c）エクソン；および（d）不對（unpaired）スプライスドナー部位。このDNA構築物における標的化配列は、細胞中の標的遺伝子へのエレメント（a）～（d）の取り込みを、エレメント（b）～（d）がその内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結されるように、指向する。別の実施形態においては、DNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列、（b）調節配列、（c）エクソン、（d）スプライスドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライスアクセプター部位；ここで、この標的化配列は、エレメント（a）～（f）の取り込みを、（b）～（f）のエレメントが内因性遺伝子に作動可能に連結されるように、指向

する。この標的化配列は、相同組換えが生じる細胞染色体DNAにおける所定の部位に相同である。この構築物において、エキソンは、一般に、調節配列の3'側であり、そしてスプライスドナー部位は、エキソンの3'側である。

【0247】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中に提示されるCloaked-2ポリペプチドの核酸配列）が既知である場合には、この遺伝子の選択された領域に相補的なDNA小片は、合成され得るか、またはさもなければ、例えば、その目的の領域に結合する特異的な認識部位でのネイティブDNAの適切な制限処理によって、得られ得る。この小片は、細胞への導入時に標的化配列として作用し、そしてゲノム内のその相同領域とハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションがDNA複製の間に起こる場合、このDNA小片およびこのDNA小片に結合した任意のさらなる配列は、岡崎フラグメントとして作用し、そして新たに合成されたDNAの娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、Cloaked-2ポリペプチドをコードするヌクレオチドを包含し、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

【0248】

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

Cloaked - 2ポリペプチドを産生することが、好ましい。同様に、Cloaked - 2ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトCloaked - 2ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが、好ましい。

【0249】

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

【0250】

生存細胞をカプセル化するための技術は、当該分野において公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびこれらの患者への移植は、慣例的に達成され得る。例えば、Baetgeら(WO95/05452およびPCT/US94/09299)は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のための、遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。これらのカプセルは生体適合性であり、そして容易に回収可能である。これらのカプセルは、プロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化し、これらの細胞は、哺乳動物宿主への移植の際に、インビボでのダウンレギュレーションに供されない。このデバイスは、生存細胞からレシピエント内の特異的な部位への分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号、同第5,011,472号、および同第5,106,627号を参照のこと。生存細胞をカプセル化するための系は、PCT出願番号PCTUS91/00157(Aebischerら)に記載されている。PCT出願番号PCT/US91/00155(Aebischerら); Winnら、Exper. Neurol., 113:322-329(1991), Aebischerら、Exper. Neurol., 1

11:269-275(1991);およびTrescoら、ASAI O, 38:17-23(1992)もまた参照のこと。

【0251】

Cloaked-2ポリペプチドのインビボおよびインビトロ遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の1つの例は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結され得るCloaked-2ポリペプチドをコードするCloaked-2遺伝子(ゲノムDNA、cDNA、および/または合成DNAのいずれか)を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内因性Cloaked-2遺伝子に対して同種であっても異種であってもよいが、但し、この構築物が挿入される細胞または組織型において、このプロモーターは、活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組み込みのために設計されたDNA分子(例えば、相同組換えのために有用な内因性配列)、組織特異的なプロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子(例えば、細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターによる発現を増強するための転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含み得る。

【0252】

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

【0253】

なお別の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞におけるCloaked-2遺伝子の制御された発現のために含まれ得る。このようなエレメントは

、適切なエフェクターに対する応答の際に、オンにされる。この様式で、治療ポリペプチドは、所望のときに発現され得る。1つの従来の制御手段は、小分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性化タンパク質）を二量体化するために使用される、小分子二量体化剤またはラパログ（rapalog）（例えば、WO9641865（PCT/US96/099486）；WO9731898（PCT/US97/03137）およびWO9731899（PCT/US95/03157）に記載されるような）の使用を包含する。このタンパク質の二量体化を使用して、導入遺伝子の転写を開始し得る。このタンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0254】

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

【0255】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中に記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。ミフェプリストン（RU486）が、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。プロゲステロンアンタゴニストに対する、改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインの結合は、2つの転写因子の二量体の形成し、次いで、これらの転写因子が、核を通過してDNAに結合することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、そのレセプターがその天然のリガンドに結合する能力を排除するよう改

変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系は、米国特許第5,364,791号;WO9640911およびWO9710337に、さらに記載されている。

【0256】

なお別の制御系は、エクジソン(ショウジョウバエのステロイドホルモン)を使用し、これは、エクジソンレセプター(細胞質レセプター)に結合し、そしてこのレセプターを活性化する。次いで、このレセプターは、核に転移して、特定のDNA応答エレメント(エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター)を結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するための、トランス活性化ドメイン/DNA結合ドメイン/リガンド結合ドメインを含む。エクジソン系は、米国特許第5,514,578号;WO9738117;WO9637609;およびWO9303162にさらに記載されている。

【0257】

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

【0258】

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

【0259】

インビボ遺伝子治療は、Cloaked-2ポリペプチドをコードする遺伝子を、Cloaked-2核酸分子の局所的注射を介してかまたは他の適切なウイルス送達ベクターもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。Hefiti, Neurobiology, 25:141

8 - 1 4 3 5 (1 9 9 4)。例えば、C l o a k e d - 2 ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターに含まれ得る (例えば、J o h n s o n , 国際公開番号 W O 9 5 / 3 4 6 7 0 ; および国際出願番号 P C T / U S 9 5 / 0 7 1 7 8)。組換え A A V ゲノムは、代表的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結された C l o a k e d - 2 ポリペプチドをコードする D N A 配列に隣接する、A A V 逆方向末端反復を含む。

【 0 2 6 0 】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、肝炎ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、コロナウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、およびパピローマウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第 5 , 6 7 2 , 3 4 4 号は、組換え神経栄養性 H S V - 1 ベクターを含む、インビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第 5 , 3 9 9 , 3 4 6 号は、治療タンパク質をコードする D N A セグメントを挿入するようインビトロで処理されたヒト細胞の送達による、患者に治療タンパク質を提供するためのプロセスの例を、提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第 5 , 6 3 1 , 2 3 6 号 (アデノウイルスベクターを含む) ; 米国特許第 5 , 6 7 2 , 5 1 0 号 (レトロウイルスベクターを含む) ; および米国特許第 5 , 6 3 5 , 3 9 9 号 (サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む) に記載されている。

【 0 2 6 1 】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸の D N A 送達 (直接注入)、レセプター媒介移入 (リガンド - D N A 複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント (例えば、遺伝子銃) が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサー - プロモーター、部位特

異的組み込みのために設計されたDNA配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全性の尺度）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号（エレクトロポレーション技術を含む）；WO96/40958（各リガンドを含む）；米国特許第5,679,559号（遺伝子送達のためのリボタンパク質含有系を記載する）；米国特許第5,676,954号（リボソームキャリアを含む）；米国特許第5,593,875号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）；および米国特許第4,945,050号（生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通しそしてこの細胞の内側に取り込まれる速度で推進されるプロセス、を記載する）に記載されている。

【0262】

C1o a k e d - 2 遺伝子治療または細胞治療が、同じまたは異なる細胞における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達をさらに含み得ることがまた意図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス（例えば、上記のカプセル化膜）内に含まれ得るか、または細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0263】

遺伝子治療を介して細胞における内因性C1o a k e d - 2 ポリペプチド発現を増加させるための手段は、1つ以上のエンハンサーエレメントをC1o a k e d - 2 ポリペプチドプロモーターに挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、C1o a k e d - 2 遺伝子の転写活性を増加させるよう作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される；この組織においてプロモーター活性化を与えることが公知であるエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、C1o a k e d - 2 ポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「オンにされる」

場合には、1 c k プロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、付加される転写エレメントの機能性部分は、標準的なクローニング技術を使用して、C l o a k e d - 2 ポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターおよび/または5' および/または3' 隣接配列などに挿入され得る）。次いで、この構築物（「相同組換え構築物」として公知）が、エキソビボでかまたはインビボでのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0264】

遺伝子治療はまた、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、C l o a k e d - 2 ポリペプチド発現を減少させるために、使用され得る。このような改変は、代表的に、相同組換え法を介して達成される。例えば、不活化について選択されたC l o a k e d - 2 遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーター片を除去および/または置換するように、操作され得る。例えば、プロモーターの転写アクチベーターのT A T Aボックスおよび/または結合部位が、標準的な分子生物学の技術を使用して、欠失され得る；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、これによって、対応するC l o a k e d - 2 遺伝子の転写を抑制する。プロモーターにおけるT A T Aボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、（調節されるC l o a k e d - 2 遺伝子と同じ種かまたは関連する種由来の）C l o a k e d - 2 ポリペプチドプロモーターの全てまたは関連する部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のT A T Aボックスおよび/または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドが、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および/または挿入を介して変異される。結果として、T A T Aボックスおよび/またはアクチベーター結合部位は、活性が減少されているか、または完全に不活性にされている。この構築物はまた、代表的に、その改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブな（内因性の）5' および3' DNA配列に対応する、少なくとも約500塩基のDNAを含む。この構築物は、直接的にかまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介して、適切な細胞に（エキソビボでかまたはインビボでかのいずれかで）導入さ

れ得る。代表的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組み込みは、相同組換えを介し、ここで、このプロモーター構築物における5'および3' DNA配列は、ハイブリダイゼーションを介するその内因性染色体DNAへの改変されたプロモーター領域の組み込みを補助するよう作用し得る。

【0265】

(Cloaked-2核酸およびCloaked-2ポリペプチドのさらなる使用)

本発明の核酸分子(それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む)を使用して、Cloaked-2遺伝子および関連する遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術(例えば、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション)により行われ得る。

【0266】

Cloaked-2核酸分子(それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む)は、定量的または定性的にのいずれかで、哺乳動物組織または体液サンプル中のCloaked-2 DNAまたは対応するRNAの存在について試験するための診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0267】

Cloaked-2ポリペプチドは、処置されている症状に適切である場合、1つ上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤、および/または化学治療剤と組み合わせて、(同時にまたは連続的に)使用され得る。

【0268】

他の方法はまた、1つ以上のCloaked-2ポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列(三重らせん形成)またはCloaked-2 mRNAに相補的でありかつ発現制御配列(三重らせん形成)またはCloaked-2 mRNAにハイブリダイズする核酸分子によりもたらされ得る。例えば、アンチセンスDNAまたはRNA分子(これらは、Cloaked-2遺伝子の少なくとも一部に相補的である

配列を有する)が、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるC l o a k e d - 2 遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択された各C l o a k e d - 2 遺伝子の開始部位(5'末端)に相補的である。このアンチセンス分子が、次いで、対応するC l o a k e d - 2 mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳は、妨げられるかまたは減少される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物におけるC l o a k e d - 2 ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

【0269】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1つ以上のC l o a k e d - 2 ポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択されたC l o a k e d - 2 ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするDNAが調製され得、そして本明細書中に記載されるウイルスまたは非ウイルスの方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的に、その生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0270】

さらに、C l o a k e d - 2 ポリペプチドは、生物学的に活性であっても活性でなくても、免疫原として使用され得、すなわち、これらのポリペプチドは、それに対して抗体が惹起され得る、少なくとも1つのエピトープを含有する。C l o a k e d - 2 ポリペプチドに結合する選択的結合因子(本明細書中に記載されるような)は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、これらの目的としては、体液サンプルまたは細胞サンプル中のC l o a k e d - 2 ポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用が挙げられるが、これに限定されない。これらの抗体もまた、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む、多数の疾患および障害を、予防、処置または診断するために使用され得る。これらの抗体は、C l o a k e d - 2 ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を減少またはブロックするようにC l o a k e d - 2 ポリペプチドに結合し得るか、またはポリペプチドに結合してC l o a k e d - 2 ポリペプチドの

少なくとも1つの活性特徴を増加し得る(Cloaked-2ポリペプチドの薬物動態を増加させることによるものを含む)。

【0271】

ヒトおよびマウスCloaked-2ポリペプチドをコードするcDNAは、2000年3月21日にATCCに寄託され、そしてそれぞれ、ATCC登録番号PTA-1616およびPTA-1615を有する。

【0272】

以下の実施例は、例示の目的のみを意図され、そして本発明の範囲をいかなる様式においても限定するとは、解釈されるべきではない。

【0273】

(実施例1)

(ヒトCloaked-2 cDNAのクローニング)

Cloaked-2の全長コード領域を含む配列を、ヒトゲノム配列からコンピューターによって組み立てた。PCRプライマーをこの配列から設計し、そしてCloaked-2の全長コード領域を含む配列を、以下の反応混合物およびPCR条件を用いてcDNAから増幅した：

鋳型：10 μ lのHuman Kidney Marathon Ready cDNA(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号7405-1)；

順方向プライマー：5' - t a c t g g a a g g t g g c g t g c c c t c c t - 3' (配列番号7)；

逆方向プライマー：5' - a a a c c a c g c g c a g a g g a c a g a a a t g t - 3' (配列番号8)；

各プライマーの終濃度：1.0 μ M；

dNTPの終濃度：200 μ M；

5ユニットのPfuポリメラーゼ(Stratagene Inc., La Jolla, CA)；

10 μ lの10×Pfu反応緩衝液(Stratagene Inc., La Jolla, CA)；

20 μ lのGC melt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR kit; カタログ番号K1907-1);

最終反応容積: 100 μ l;

サイクリング条件: 94 で45秒間、続いて94 (12秒)、62 (30秒)、72 (50秒)を38サイクル、次いで、38回目のサイクルの最後に、72 で3分間インキュベーション。

【0274】

PCR反応物を、アガロースゲル上で泳動し、そして759塩基対のCloaked-2 PCR産物を、このアガロースゲルから単離し、そしてpPCR-Script Amp SK(+)(Stratagene Inc., La Jolla, CA)に平滑末端でクローン化した。多数のクローンを配列決定し、そしてそれらの全てが、ヒトCloaked-2の全長コード領域を含むことを見出した。

【0275】

(実施例2)

(マウスCloaked-2 cDNAのクローニング)

3つのラットCloaked-2 ESTの配列を用いて、ラットCloaked-2コード領域配列の領域に相同性のPCRプライマーを設計し、そして以下の反応混合物およびPCR条件を使用してマウスCloaked-2コード領域の領域を増幅するために使用した:

鋳型: 5 μ lのMouse Testis Marathon Ready cDNA (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号7455-1);

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

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

各プライマーの終濃度: 1.0 μ M;

dNTPの終濃度：200 μ M；

1 μ lのAdvantage cDNAポリメラーゼミックス(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA；カタログ番号8417-1)；

5 μ lの10×cDNA PCR反応緩衝液(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA；カタログ番号8417-1)；

最終反応容積：50 μ l；

サイクリング条件：94 で60秒間、続いて94 (25秒間)、60 (30秒間)、72 (45秒間)を35サイクル、次いで、35回目のサイクルの最後に、72 で7分間インキュベーション。

【0276】

PCR反応物を、アガロースゲル上で泳動し、そして340塩基対の産物を、このアガロースゲルから単離し、そしてpCR-TOPO 2.1 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA；TOPO TA Cloning Kit, カタログ番号450641)にクローン化した。配列決定によって、ヒトCloaked-2に非常に関連するポリペプチドをコードする配列を含むいくつかのクローンを同定し、このようにして、当のクローン中の挿入物がマウスCloaked-2 cDNA配列の一部を含むとして同定した。マウスCloaked-2の全長コード領域の配列を得る目的のもとでの5' RACE反応および3' RACE反応における使用のために、プライマーを、このマウス配列から設計した。

【0277】

5' RACEは、以下の反応混合物およびPCR条件を用いて実施した：

(5' RACEプライマーPCR)

鋳型：5 μ lのMouse Testis Marathon Ready cDNA (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA；カタログ番号7455-1)；

順方向プライマー：5' - ccattcctaatacgactcactata

g g g c - 3' (配列番号11);

逆方向プライマー; 5' - t g t c a g g a a g c g g g t g t a g t g c a

g - 3' (配列番号12);

各プライマーの終濃度: 1.0 μ M;

dNTPの終濃度: 200 μ M;

1 μ lのAdvantage GC cDNAポリメラーゼミックス(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1);

10 μ lの5×GC cDNA PCR反応緩衝液(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1);

2 μ lのGC-Melt(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1);

最終反応容積: 50 μ l;

サイクリング条件: 94 で60秒間、続いて、94 (15秒間)、70 (90秒間)の5サイクル、次いで94 (15秒間)、68 (90秒間)の5サイクル、次いで94 (15秒間)、66 (90秒間)の30サイクル、次いで、30回目のサイクルの最後に、70 で5分間インキュベーション。

【0278】

(5' RACE Nested PCR)

鋳型: 上記第1の、5' RACE第1PCRのうちの1 μ l;

順方向プライマー: 5' - a c t c a c t a t a g g g c t c g a g c g g c
- 3' (配列番号13);

逆方向プライマー: 5' - g g a c a c a t c t t t g g c g t c a t a g g
g a - 3' (配列番号14);

各プライマーの終濃度: 1.0 μ M;

dNTPの終濃度: 200 μ M;

1 μ lのAdvantage GC cDNAポリメラーゼミックス (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1)。

【0279】

10 μ lの5×GC cDNA PCR反応緩衝液 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1)。

【0280】

2 μ lのGC-Melt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1) ;

最終反応容積 : 50 μ l ;

サイクリング条件 : 94 で60秒間、続いて、94 (15秒間)、70 (90秒間) の3サイクル、次いで、94 (15秒間)、68 (90秒間) の3サイクル、次いで、94 (15秒間)、66 (90秒間) の25サイクル、次いで、25回目のサイクルの終わりに70 で5分間のインキュベーション。

【0281】

5' RACE Nested PCR反応物を精製し、そしてpCR4-TOPO (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA; TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, カタログ番号450030) にクローン化した。配列決定によって、マウスCloaked-2に相同性の配列を含むクローンを同定した。

【0282】

3' RACEを、以下の反応混合物およびPCR条件を用いて実施した :

(3' RACE第1PCR)

鋳型 : 5 μ lのMouse Testis Marathon Ready cDNA (Clontech Laboratories, Inc., Palo

Alto, CA; カタログ番号7455-1)。

【0283】

順方向プライマー: 5' - t a c a c c c g c t t c c t g a c a g a c - 3'
(配列番号15);

逆方向プライマー: 5' - c c a t c c t a a t a c g a c t c a c t a t a
g g g c - 3' (配列番号16);

各プライマーの終濃度: 1.0 μ M;

dNTPの終濃度: 200 μ M;

1 μ lのAdvantage GC cDNAポリメラーゼミックス(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1);

10 μ lの5 $\times$ GC cDNA PCR反応緩衝液(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1);

5 μ lのGC-Melt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1);

最終反応容積: 50 μ l;

サイクリング条件: 94 で60秒間、続いて、94 (15秒間)、70 (90秒間)の5サイクル、次いで、94 (15秒間)、68 (90秒間)の5サイクル、次いで、94 (15秒間)、66 (90秒間)の30サイクル、次いで、30回目のサイクルの終わりに70 で5分間のインキュベーション。

【0284】

(3' RACE Nested PCR)

鋳型: 上記の3' RACE第1PCRのうちの1 μ l。

【0285】

順方向プライマー: 5' - g g t c a c c g a g t t g g t g t g c t c - 3'

' (配列番号17) ;

逆方向プライマー : 5' - a c t c a c t a t a g g g c t c g a g c g g c

- 3' (配列番号18) ;

各プライマーの終濃度 : 1.0 μ M ;

dNTPの終濃度 : 200 μ M ;

1 μ lのAdvantage GC cDNAポリメラーゼミックス (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA ; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1) ;

10 μ lの5 $\times$ GC cDNA PCR反応緩衝液 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA ; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1) ;

5 μ lのGC-Melt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA ; Advantage GC cDNA PCR Kit, カタログ番号K1907-1) ;

最終反応容積 : 50 μ l ;

サイクリング条件 : 94 で60秒間、続いて、94 (15秒間)、70 (90秒間) の3サイクル、次いで、94 (15秒間)、68 (90秒間) の3サイクル、次いで、94 (15秒間)、66 (90秒間) の25サイクル、次いで、25回目のサイクルの終わりに70 で5分間のインキュベーション。

【0286】

3' RACE Nested PCR反応物を精製し、そしてpCR4-TOPO (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA ; TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, カタログ番号450030) にクローン化した。配列決定によって、マウスCloaked-2に相同性の配列を含むいくつかのクローンを同定した。

【0287】

5' RACEからの配列、340塩基対の上記に言及したマウスCloake

d - 2 PCR産物からの配列および3' RACEからの配列をコンピューターによってコンティグ (contig) に組み立てた。これらのマウスコンティグ配列とヒトCloaked - 2配列との比較によって、マウスCloaked - 2全長コード領域が、マウスコンティグに存在したことが示された。

【0288】

PCRプライマーを、マウスコンティグから設計し、以下の反応混合物およびPCR条件を用いて、マウスCloaked - 2の全長コード領域を単一フラグメントとしてクローン化した：

鋳型：10 μ lのMouse Testis Marathon Ready cDNA (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号7455-1)；

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

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

各プライマーの終濃度：1.0 μ M；

dNTPの終濃度：200 μ M；

5ユニットのPfuポリメラーゼ (Stratagene, La Jolla, CA)；

10 μ lの10 $\times$ Pfu反応緩衝液 (Stratagene, La Jolla, CA)；

20 μ lのGC melt (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; Advantage GC cDNA PCR kit; カタログ番号K1907-1)；

最終反応容積：100 μ l；

サイクリング条件：95 で90秒間、続いて、94 (12秒間)、65 (30秒間)、72 (50秒間)の5サイクル、次いで、94 (12秒間)、60 (30秒間)、72 (50秒間)の35サイクル、次いで、35回目のサイクルの終わりに72 で5分間のインキュベーション。

【0289】

PCR反応物を精製し、Spe IおよびBamH Iを用いて切断し、そしてアガロースゲル上で泳動した。665塩基対のバンドを、ゲルから単離し、そしてSpe I - BamH Iで二重消化したpBluescript II (KS-)にクローン化した。多数のクローンを、配列決定し、そしてそれらの全てが、マウスCloaked-2の全長コード領域を含むことを見出した。

【0290】

(実施例3)

(異なる組織におけるmRNAの存在および分布)

Cloaked-2の全長コード領域を含む配列を、ヒトゲノム配列からコンピューターによって組み立てた。PCRプライマーを、この配列から設計し、以下の反応混合物およびPCR条件を用いてcDNAから376塩基対のコード領域サブフラグメントを増幅した：

鋳型：10 μ lのHuman Prostate Marathon Ready cDNA (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号7418-1)；

順方向プライマー：5' - t g t g t c t c g t c t g c c t g c t g g t a c a c a - 3' (配列番号21)；

逆方向プライマー：5' - g a a g t c g g g c c c a c t a g g t c g c c - 3' (配列番号22)；

各プライマーの終濃度：1.0 μ M；

dNTPの終濃度：200 μ M；

1 μ lのAdvantage cDNAポリメラーゼミックス (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号8417-1)；

5 μ lの10 $\times$ cDNA PCR反応緩衝液 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号8417-1)；

最終反応容積：50 μ l；

サイクリング条件：94 で60秒間、続いて、94 (25秒間)、70 (30秒間)、72 (60秒間)の35サイクル、次いで、35回目のサイクルの終わりに72 で10分間のインキュベーション。

【0291】

PCR産物を、アガロースゲル上で泳動し、そして376塩基対のCloaked-2 PCR産物を、このアガロースゲルから単離し、そしてpCR-TOPO 2.1 (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA; TOPO TA Cloning Kit, カタログ番号45-0641)にクローン化した。挿入物を、配列決定し、予想された配列が増幅され、そしてクローン化されたことを確認した。Cloaked-2挿入物を含む400塩基対のEcoRIフラグメントを、アガロースゲル電気泳動によってこのクローンから単離し、そして³²Pを用いて標識し、そして以下のような高度なストリンジェンシー条件を用いて、複数の組織(脳、心臓、骨格筋、結腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、末梢血白血球、前立腺、精巣、卵巣、扁桃、尾状核、脳梁、海馬、脳全体、黒質、視床、睪臓、副腎髄質、甲状腺、副腎皮質および胃)を示すClontech Human Multiple Tissue Northern Blotに対してハイブリダイズさせた：

プレハイブリダイゼーションを、ExpressHybハイブリダイゼーション溶液(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA; カタログ番号8015-2)を用いて68 で一晩実行した。ハイブリダイゼーションを、標識したCloaked-2プローブを含む新しいExpressHybハイブリダイゼーション溶液を用いて、90分間、68 にて実行した。このプロットを、2×SSC、0.05% SDS中、室温で2回(各回、1分間)リンスした。次いで、このプロットを、2×SSC、0.05% SDS中、室温で2回(各回、20分間)リンスした。次いで、このプロットを、0.1×SSC、0.1% SDS中、50 で3回(各回、15分間)リンスし、そして引続いてフィルムに感光させた。

【0292】

ノーザン分析の結果から、Cloaked-2が腎臓および心臓において最も

強く発現されたことが示された。いくらか弱い発現が、胎盤および骨格筋において検出された。より低い発現が、肝臓、脾臓、甲状腺、副腎髄質、扁桃、および視床中で検出された。

【0293】

【表3】

出願人または代理人の ファイル番号	01017/37428PCT	国際出願番号	
寄託された微生物または他の生物学的物質に関する表示 (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。 16 頁、 20-22 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 プールバード 10801			
寄託日	2000年3月31日	受託番号	PTA-1615, PTA-1616
C. 追加の表示（なければ空白のまま）		この情報は追加の用紙に続く ☐	
欧州特許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は、試料の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となされる。（EPC規則23(4)）			
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）			
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、進んで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	
☒ この用紙は国際出願とともに受理された		☐ この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された	
認定官		認定官	

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1 Aは、推定シグナルポリペプチドを含むヒトC l o a k e d - 2 ポリペプチドをコードするヒトC l o a k e d - 2 cDNA配列（配列番号1）を示す。開始メチオニンコドン（A T G）および終止コドン（T A G）は太字であり、かつより大きい字体で示す。推定シグナルペプチド領域をコードするヌクレオチド配列は、下線が引かれている。

図1 Bは、ヒトC l o a k e d - 2 ポリペプチドの予期される成熟形態（すなわち、推定シグナルペプチドが分割されている）のアミノ酸配列（配列番号2）を示す。30位および152位のアスパラギン（N）残基は、古典的なN x S / Tグリコシル化モチーフ内に位置し、そしてグリコシル化されている可能性が非常に高い。古典的なシステイン - ノットモチーフ（C x G x CおよびC x C）は、より大きい字体で示され、かつ下線が引かれている。4つのさらなるシステインは、より大きい字体かつ太字で示される。C x G x CモチーフおよびC x Cモチーフにおけるシステインは、システイン番号2および3を示し、そしてそれぞれシステイン - ノットを形成する6つのシステインのシステイン番号5および6を示す。システイン - ノットのシステイン番号1は、ヒトC l o a k e d - 2 についてのシステイン57または71のいずれかである。システイン - ノットのシステイン番号4は、ヒトC l o a k e d - 2 についてのシステイン111または125のいずれかである。全ての公知のシステイン - ノットポリペプチドについて、6つのシステインは、以下の対形成において3つのジスルフィド結合を形成する：システイン番号1および4、システイン番号2および5、システイン番号3および6。

図1 Cは、ヒトC l o a k e d - 2 ポリペプチド（配列番号5）の全コード領域を示す。推定シグナルポリペプチドは、下線が引かれている。

【図2】

図2 Aは、推定シグナルポリペプチドを含むマウスC l o a k e d - 2 ポリペプチドをコードするマウスC l o a k e d - 2 cDNA配列（配列番号3）を示す。開始メチオニンコドン（A T G）および終止コドン（T A G）はより大きい字体かつ太字で示される。推定シグナルペプチド領域をコードするヌクレオチド配列は、下線が引かれている。

図2Bは、マウスC1oaked-2の予期される成熟形態（すなわち、推定シグナルペプチドが分割されている）のアミノ酸配列（配列番号4）を示す。28位および150位のアスパラギン（N）残基は、古典的なN×S/Tグリコシル化モチーフ内に位置し、そしてグリコシル化されている可能性が非常に高い。古典的なシステイン-ノットモチーフ（C×G×CおよびC×C）は、より大きい字体で示され、かつ下線が引かれている。4つのさらなるシステインは、より大きい字体かつ太字で示される。C×G×CモチーフおよびC×Cモチーフにおけるシステインは、システイン番号2および3を示し、そしてそれぞれシステイン-ノットを形成するシステイン番号5および6を示す。システイン-ノットのシステイン番号1は、マウスC1oaked-2についてのシステイン55または69のいずれかである。システイン-ノットのシステイン番号4は、マウスC1oaked-2についてのシステイン109または123のいずれかである。全ての公知のシステイン-ノットポリペプチドについて、6つのシステインは、以下の対形成において3つのジスルフィド結合を形成する：システイン番号1および4、システイン番号2および5、システイン番号3および6。

図2Cは、マウスC1oaked-2ポリペプチドの全コード領域を示す（配列番号6）。推定シグナルポリペプチドは、下線が引かれている。

【図3】

図3は、配列番号5のヒトC1oaked-2ポリペプチドと配列番号6のマウスC1oaked-2ポリペプチドとの間の有意な程度の相同性（GAP分析による）を示す。

【図4】

図4は、ヒトC1oaked-1ポリペプチド（配列番号25）の最も予期される成熟形態（すなわち、シグナルペプチドが分割された）とヒトC1oaked-2ポリペプチド（配列番号2）の最も予期される成熟形態（すなわち、シグナルペプチドが分割された）との間の有意な程度の相同性（GAP分析による）を示す。ヒトC1oaked-1のアミノ酸配列は、例えば、Hastingsらの1998年7月14日に発行された米国特許第5,780,263号において見出され得る。古典的なシステイン-ノットモチーフ（C×G×CおよびC×

C) は保存され、そして下線で示される。4つのさらなる保存されたシステインは、より大きい太字体で示される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Amgen, Inc.
<120> Cysteine Knot Polypeptides: Cloaked-2 Molecules and Uses Thereof
<130> 01017/37428
<150> US 60/208,550
<151> 2000-06-01
<150> US 60/223,542
<151> 2000-08-04
<160> 25
<170> PatentIn version 3.0
<210> 1
<211> 759
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
tactggaagg tggcgtgccc tcctctggct ggtaccatgc agctcccact ggccctgtgt      60
ctcgtctgcc tgctggtaca cacagccttc cgtgtagtgg agggccaggg gtggcaggcg      120
ttcaagaatg atgccacgga aatcatcccc gagctcggag agtaccocga gcctccaccg      180
gagctggaga acaacaagac catgaaccgg gcggaagaac gagggcggcc tccccaccac      240
ccctttgaga ccaaagacgt gtccgagtac agctgccgcg agctgcactt caccgctac      300
gtgaccgatg ggccgtgccg cagcgccaag ccggtcaccg agctggtgtg ctccggccag      360
tgcgggccgg cgcgcctgct gcccacgcc atcgcccgcg gcaagtgggtg gcgacctagt      420
gggcccgaact tccgtgcat ccccgaccgc taccgcgcgc agcgctgca gctgctgtgt      480
cccggtggtg aggcgcgcgc cgcgcgcaag gtgcgcctgg tggcctcgtg caagtgaag      540
cgctcaccg gcttccacaa ccagtcggag ctcaaggact tcgggaccga ggcgcctcgg      600
ccgcagaagg gccggaagcc gcggccccgc gcccggaagc ccaaagccaa ccaggccgag      660
ctggagaacg cctactagag cccgcccgcg cccctcccca ccggcgggcg ccccgccct      720
gaaccgcgcg cccacatttc tgcctctgc gcgtggttt      759

<210> 2
<211> 190
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

```

Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu

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

<210> 3
 <211> 636
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 3

atgcagccct cactagcccc gtgcctcatc tgctacttg tgcacgctgc cttctgtgct 60
 gtggagggcc aggggtggca agccttcagg aatgatgcca cagaggtcat ccagggctt 120
 ggagagtacc ccgagcctcc tcctgagaac aaccagacca tgaaccgggc ggagaatgga 180
 ggcagacctc ccacccatcc ctatgacgcc aaagatgtgt ccgagtacag ctgccgcgag 240
 ctgcactaca cccgcttcct gacagacggc ccatgccgca gcgccaagcc ggtcaccgag 300
 ttggtgtgct ccggccagtg cggccccgcg cggtgtgtgc ccaacgccat cgggcccgtg 360
 aagtgggtggc gcccgaaagg accggatttc cgtgcaccc cggatcgcta ccgcgcgag 420
 cgggtgcagc tgctgtgccc cgggggcccgc gcgccgcgt cgcgcaagg ggtctgtgtg 480
 gcctcgtgca agtgcaagcg cctcaccgcg ttccacaacc agtcggagct caaggacttc 540
 gggccggaga ccgcccggcc gcagaagggt cgcaagccgc ggcccggcgc cgggggagcc 600

aaagccaacc aggcggagct ggagaacgcc tactag

636

<210> 4
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

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

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

<400> 5

Met Gln Leu Pro Leu Ala Leu Cys Leu Val Cys Leu Leu Val His Thr
 1 5 10 15
 Ala Phe Arg Val Val Glu Gly Gln Gly Trp Gln Ala Phe Lys Asn Asp
 20 25 30
 Ala Thr Glu Ile Ile Pro Glu Leu Gly Glu Tyr Pro Glu Pro Pro Pro
 35 40 45

Glu Leu Glu Asn Asn Lys Thr Met Asn Arg Ala Glu Asn Gly Gly Arg
 50 55 60
 Pro Pro His His Pro Phe Glu Thr Lys Asp Val Ser Glu Tyr Ser Cys
 65 70 75 80
 Arg Glu Leu His Phe Thr Arg Tyr Val Thr Asp Gly Pro Cys Arg Ser
 85 90 95
 Ala Lys Pro Val Thr Glu Leu Val Cys Ser Gly Gln Cys Gly Pro Ala
 100 105 110
 Arg Leu Leu Pro Asn Ala Ile Gly Arg Gly Lys Trp Trp Arg Pro Ser
 115 120 125
 Gly Pro Asp Phe Arg Cys Ile Pro Asp Arg Tyr Arg Ala Gln Arg Val
 130 135 140
 Gln Leu Leu Cys Pro Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ala Arg Lys Val Arg
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Ser Cys Lys Cys Lys Arg Leu Thr Arg Phe His Asn Gln
 165 170 175
 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Gly Thr Glu Ala Ala Arg Pro Gln Lys Gly
 180 185 190
 Arg Lys Pro Arg Pro Arg Ala Arg Ser Ala Lys Ala Asn Gln Ala Glu
 195 200 205
 Leu Glu Asn Ala Tyr
 210

<210> 6
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

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

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

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

<220>
 <223> Artificial: PCR primer

<400> 7

tactggaagg tggcgtgccc tcct

24

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial: PCR primer

<400> 8

aaaccacgcg cagaggacag aaatgt

26

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial: PCR primer

<400> 9

gccaggggtg gcaagccttc aagaatgat

29

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Artificial: PCR primer

<400> 10

cgatccggga tgcagcggaa gtcg

24

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial: PCR primer

<400> 11

ccatcctaatac gactcact atagggc

27

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial: PCR primer

<400> 12

tgtcaggaag cgggtgtagt gcag

24

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial: PCR primer

<400> 13

actcactata gggctcgagc ggc

23

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial: PCR primer

<400> 14

ggacacatct ttggcgtcat aggga

25

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

```

<213> Artificial
<220>
<223> Artificial: PCR primer
<400> 15
tacacccgct tcctgacaga c 21

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Artificial: PCR primer
<400> 16
ccatcctaatacgcactcact atagggc 27

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Artificial: PCR primer
<400> 17
ggtcaccgag ttggtgtgct c 21

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Artificial: PCR primer
<400> 18
actcactata gggctcgagc ggc 23

<210> 19
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Artificial: PCR primer
<400> 19
cgtactagta agcttcacc atgcagccct cactagcccc gtgcc 45

```

<210> 20
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial: PCR primer

<400> 20

tttggatccc gatcgctagt aggcgttctc cagctccgcc t 41

<210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial: PCR primer

<400> 21

tgtgtctcgt ctgcctgctg gtacaca 27

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

<220>
 <223> Artificial: PCR primer

<400> 22

gaagtcgggc ccactaggtc gcc 23

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial: HIV TAT peptide

<400> 23

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial: FITC conjugated - HIV TAT peptide construct

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

```

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

```

【図1】

Figure 1

A. シグナルペプチドを有するヒトCloaked-2ポリペプチド

をコードする核酸 (配列番号1)

```

1 TACTGGAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCGAGCTCCCACT
51 GGCCCTGTGTCTCGTCTGCCTGCTGGTACACACAGCCCTCCGTGTAGTGG
101 AGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATGCCACGGAAATCATCCCC
151 GAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGAGCTGGAGAACACAAGAC
201 CATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGCCTCCCCACCACCCCTTTGAGA
251 CCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTTCACCCGCTAC
301 GTGACCGATGGGCCGTGCGCGCAGCGCCAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTG
351 CTCGGGCCAGTGGCGCCCGCGCGCCTGCTGCCCAACGCCATCGGCGCGG
401 GCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCGCGACTTCCGCTGCATCCCGGACCGC
451 TACCGCGCGCAGCGCGTGCAGCTGCTGTCTCCGGTGGTGAGGCGCGCGG
501 CGCGCGCAAGGTGCGCCTGGTGGCCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACCC
551 GCTTCCACAAACCAGTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGG
601 CCGCAGAAGGCCCGGAAGCGCGGCCCGCGCCCGGAGCGCCAAAGCCAA
651 CCAGGCGGAGCTGGAGAACCCCTACTAGAGCCCGCCCGGCCCTCCCCA
701 CCGGCGGGCGCCCGGCCCTGAACCGCGCCCCACATTTCTGTCTCTGC
751 GCGTGGTTT

```

B. ヒトCloaked-2ポリペプチドの最も予期される成熟形態

(配列番号2)

```

1 QGWQAFKNDATETIIPELGEYPEPPPELENNKTMNRAENGGRPPHHPFETK
51 DVSEYS CRELHFTRYVTDGPPCRSAKPVTELVC CSGQCGPARLLPNAIGRGK
101 WWRPSGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGEAPRARKVRLVAS CKCKRLTRF
151 HNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

```

C. シグナルペプチドを有するヒトCloaked-2ポリペプチド

(配列番号5)

```

1 MOLFLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATETIIPELGEYPEPPPEL
51 ENNKTMNRAENGGRPPHHPFETKDVSEYS CRELHFTRYVTDGPPCRSAKPV
101 TELVC SGQCGPARLLPNAIGRGKWWRPSPGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPG
151 GEAPRARKVRLVAS CKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRAR
201 SAKANQAELENAY

```

【図2】

Figure 2

A. シグナルペプチドを有するマウスCloaked-2ポリペプチド

をコードする核酸 (配列番号3)

```

1  ATGCAGCCCTCACTAGCCCCGTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCACGCTGC
51  CTTCTGTGCTGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAGGAATGATGCCA
101 CAGAGGTTCATCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCTCCTGAGAAC
151 AACCAGACCATGAACCGGGCGGAGAATGGAGGCAGACCTCCCCACCATCC
201 CTATGACGCCAAGATGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACA
251 CCCGCTTCCTGACAGACGGCCCATGCCGCGAGGCCAAGCCGGTCACCGAG
301 TTGTTGTGCTCCGGCCAGTGCAGGCCCGCGCGGCTGCTGCCCAACGCCAT
351 CGGGCGCGTGAAGTGGTGGCGCCCGAACGACCGGATTTCGGCTGCATCC
401 CGGATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGACGCTGCTGTGCCCGGGGGCGCG
451 GCGCCGCGCTCGCGCAGGTGCGTCTGGTGGCCCTCGTGCAAGTCAAGCG
501 CCTCACCCGCTTCCACAACCACTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGCCGAGA
551 CCGCGCGGCCGAGAGGGTCCGAAGCCGCGCCCGCGCCCGGGGAGCC
601 AAAGCCAACCAAGCGGAGCTGGAGAACGCTACTAG

```

B. マウスCloaked-2ポリペプチドの最も予期される成熟形態

(配列番号4)

```

1  QGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPPENNQTMNRAENGGRPPHPYDAKDV
51  SEYSCRELHYTRFLTDGPCRSAPVTELVCSGQCGPARLLPNAIGRVKWW
101 RPNGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGAAPRSRKVRLVASCKCKRLTRFHN
151 QSELKDFGPETARPQKGRKPRPGARGAKANQAELENAY

```

C. シグナルペプチドを有するマウスCloaked-2ポリペプチド

(配列番号6)

```

1  MQPSLAPCLICLLVHAAFCAVEGQGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPPEN
51  NQTMNRAENGGRPPHPYDAKDVSEYS CRELHYTRFLTDGPCRSAPVTE
101 LVCSGQCGPARLLPNAIGRVKWWRPNGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGA
151 APRSRKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGPETARPQKGRKPRPGARGA
201 KANQAELENAY

```

Figure 3

記号比較表：

rundata/blosum62, cmp

CompCheck: 6430

ギャップ重量: 8 平均一致: 2.912

長さ重量: 2 平均不一致: -2.003

質: 1028 長さ: 213

比率： 4. 872 ギャップ： 1

パーセント類似性: 91.469 パーセント同一性: 88.152

整列のための一致表示の閾値:

一、獨一性

$$:= 2$$

• 11 1

ヒトCloaked-2 (配列番号5) X

マウスCloaked-2 (配列番号6)

1 MOLPLALCLVCLLVHTAFRVVEGQGWQAFKNDATETIIPELGEYPEPPPEL 50

1 MOPSLAPCLICLLVHAAFCAVEGQGWQAFRNDATEVIPGLGEYPEPPP.. 48

51 ENNKTMNRAENGGRPPHPFETKDVSEYSCRELHFTRYVTDGPCRSAPV 100

49 ENNQTMNRAENGGRPPHPYDAKDVSSEYSCRELHYTFRLTDGPCRSAPV 98

101 TELVCSGQCGPARLLPNAIGRGKWWRPSPGPDFRCIPDRYRAQRVOLLCPG 150

99 TELVCSGQCGPARLLPNAIGRVKWWRPNGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPG 148

151 GEAPRARKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAAPQKGRKPRPRAR 200

149 GAAPRSRKVRLVASCKCKRLTRFHNOSELKDFGPETARPOKGRKPRPGAR 198

201 SAKANQAELENAY 213

199 GAKANQAELENAY 211

【図4】

Figure 4

ヒトCloaked-2 チェック:185 1~190に対する
 ヒトCloaked-1 チェック:1888 1~183のギャップ

記号比較表:

/GCGDISK/gcg10/gcgcore/data/
 rundata/blosum62.cmp
 CompCheck: 6430

ギャップ重量: 8 平均一致: 2.912
 長さ重量: 2 平均不一致: -2.003

質: 335 長さ: 196
 比率: 1.831 ギャップ: 8
 パーセント類似性: 52.542 パーセント同一性: 42.938

整列のための一致表示の閾値:

| = 同一性
 : = 2
 . = 1

ヒトCloaked-1 (配列番号25) ×
ヒトCloaked-2 (配列番号2)

```

1 .....FKNDATEILYSHVVKP.VPAHPSSNSTLNQARNNGGRHFSNTGLDR 44
   |||||: | | . | : | ||| :
1 QGWQAFKNDATEIIPELGEYPEPPPELENNKIMNRAENGGRP.PHPFET 49

45 NTRVQVGCRELIRSTKYISDGCTTSISPLKELVCAGECLPLPVLPNWIGGG 94
   : ||| | : | : | | | | . ||| | : | | . ||| | |
50 KDVSEYSCRELHFTRYVTDGPCRSAKPVTELVCSSGQCGPARLLPNAIGRG 99

95 YGKYWSRRSSQEWRCVNDKTRTORIQLOCQDG.STRTYKITVVTTACKCK 143
   | : | | | : | : | : | | : | | | . | | : . | | |
100 ...KWW.RPSGPDFRCIPDRYRAQRVQLLCPGGGEAPRARKVRLVASCKCK 145

144 RYTRQHNESSHNFFESMSPAKPVQHRERKRASKSSKHSMS..... 183
   | | | | : | | . : | | : | . .
146 RLTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRA.RSAKANQAELENAY 190
  
```

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/17478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 C12N15/83	C07K14/47 C12N15/62 A61K9/00
C07K16/18 A61K9/00	G01N33/50 A01K67/00	A61K38/17
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N C07K G01N A61K A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 32773 A (DARWIN DISCOVERY LTD ; GALAS DAVID J (US); BRUNKOW MARY E (US); MUL) 8 June 2000 (2000-06-08) SEQ ID NOs 1,2,6,8-12,15,16	1-11, 13-15, 22-49, 52-56, 58,61,62
P, X	BRUNKOW ME ET AL: "Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS., vol. 68, March 2001 (2001-03), pages 577-589, XP001052847 AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS, CHICAGO, IL., US ISSN: 0002-9297 figures 5-7	1-11, 13-15, 22,23
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
28 January 2002		11/02/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Esen, J

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/17478

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00 55193 A (ECONOMIDES ARIS N ; REGENERON PHARMA (US)) 21 September 2000 (2000-09-21) figures 2,3 ---	1,2,4-9, 11,13, 14, 22-49, 52,58,60
P,X	BALEMANS W ET AL: "Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST)" HUMAN MOLECULAR GENETICS., vol. 10, no. 5, 1 March 2001 (2001-03-01), page 537-543 XP001058218 OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY., GB ISSN: 0964-6906 figure 3 ---	1-11, 13-15, 22,23
A	WO 96 39486 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; ADAMS MARK D (US); HASTINGS GREGG A (US)) 12 December 1996 (1996-12-12) -----	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: in part:29,41,42

Present claims 29,41,42 relate to an agent or fragment thereof defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that specifically binds at least one polypeptide relating to SEQ ID NO 2 or 4 and additionally has antagonizing properties (claim 42).

The claims cover all agents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the agent by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to an antibody or fragment thereof binding to a polypeptide relating to SEQ ID NO 2 or 4.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/17478

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0032773	A	08-06-2000	AU 2031300 A	19-06-2000
			EP 1133558 A1	19-09-2001
			WO 0032773 A1	08-06-2000
WO 0055193	A	21-09-2000	AU 3511100 A	04-10-2000
			WO 0055193 A2	21-09-2000
WO 9639486	A	12-12-1996	CA 2220912 A1	12-12-1996
			US 5780263 A	14-07-1998
			WO 9639486 A1	12-12-1996
			AU 2766595 A	24-12-1996
			EP 0871705 A1	21-10-1998
			JP 11506918 T	22-06-1999

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
A 6 1 P	1/18	A 6 1 P	5/06	4 B 0 6 5
	3/10		5/14	4 C 0 8 4
	5/06		5/40	4 H 0 4 5
	5/14		7/00	
	5/40		7/06	
	7/00		9/00	
	7/06		9/02	
	9/00		9/04	
	9/02		9/06	
	9/04		9/10	
	9/06			1 0 3
	9/10		9/12	
		1 0 3	13/12	
	9/12		15/06	
	13/12		17/02	
	15/06		21/04	
	17/02		25/18	
	21/04		25/22	
	25/18		25/24	
	25/22		35/00	
	25/24		43/00	
	35/00	C 0 7 K	14/47	
	43/00		16/18	
C 0 7 K	14/47		16/46	
	16/18		19/00	
	16/46	C 1 2 M	1/00	Z
	19/00	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 M	1/00		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	C 1 2 Q	1/02	
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
	15/02		33/50	Z
C 1 2 P	21/02		33/53	D
C 1 2 Q	1/02			M
G 0 1 N	33/15		33/566	
	33/50	C 1 2 P	21/08	
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A
	33/566			B
// C 1 2 P	21/08		15/00	C
		A 6 1 K	37/02	

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

(72)発明者 ガオ, ヨンミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91360,
 サウザンド オークス, セント チャ
 ールズ ドライブ 897, ナンバー15

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 DA13 DA36 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02
 DA06 DA12 EA04 HA01 HA14
 HA17
 4B029 AA27 BB11 CC05
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ79 QQ94
 QR77 QS33 QS36 QX02 QX07
 4B064 AG01 AG26 AG27 CA10 CA19
 CA20 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA26X AA90X AA91Y AA93Y
 AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08
 BA22 CA53 DB52 MA13 MA24
 MA35 MA37 MA52 MA58 MA66
 ZA052 ZA122 ZA182 ZA362
 ZA382 ZA402 ZA422 ZA432
 ZA452 ZA552 ZA662 ZA702
 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942
 ZB262 ZC062 ZC082 ZC352
 ZC542
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 BA41 BA56 CA40 DA75 DA76
 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	胱氨酸结多肽：CLOAKED-2分子及其用途		
公开(公告)号	JP2003534813A	公开(公告)日	2003-11-25
申请号	JP2002500919	申请日	2001-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	パツティー・クリストファー・ジェイ ガオ・ヨンミン		
发明人	パツティー, クリストファー・ジェイ. ガオ, ヨンミン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/06 A61P5/14 A61P5/40 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P13/12 A61P15/06 A61P17/02 A61P21/04 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/51 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P13/12 A61P15/06 A61P17/02 A61P21/04 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 C07K14/47 C07K14/51 C07K2319/00 C12N2799/021 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158		
FI分类号	A01K67/027 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/06 A61P5/14 A61P5/40 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/02 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/10.103 A61P9/12 A61P13/12 A61P15/06 A61P17/02 A61P21/04 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.C A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA17 4B029/AA27 4B029/BB11 4B029/CC05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QQ94 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DB52 4C084/MA13 4C084/MA24 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA58 4C084/MA66 4C084/ZA052 4C084/ZA122 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4C084/ZA382 4C084/ZA402 4C084/ZA422 4C084/ZA432 4C084/ZA452 4C084/ZA552 4C084/ZA662 4C084/ZA702 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZB262 4C084/ZC062 4C084/ZC082 4C084/ZC352 4C084/ZC542 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA56 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/208550 2000-06-01 US 60/223542 2000-08-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在本发明中，我们鉴定了一种新型的人分泌多肽，该多肽既包含胱氨酸结基序（C_xG_xC和C_xC），又符合我们针对高度特异性“C_xG_xC胱氨酸结图谱”的标准。该多肽被命名为“Cloaked-2”。本发明涉及新颖的Cloaked-2多肽和编码该多肽的核酸

分子。本发明还提供了载体，宿主细胞，选择性结合剂和产生Cloaked-2多肽的方法。还提供了使用Cloaked-2多肽治疗，诊断，改善或预防疾病的方法。

表I アミノ酸置換

元の残基	例示的置換	正しい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-ジ"アミ"-酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu