

(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2002 - 543784

(P2002 - 543784A)

(43)公表日 平成14年12月24日(2002.12.24)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 0 7 K 14/505	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/505		16/22	4 B 0 6 4
16/22		19/00	4 B 0 6 5
19/00		C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19		1/21	

審査請求 有 予備審査請求 (全158数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 616342(P2000 - 616342)

(86)(22)出願日 平成12年5月5日(2000.5.5)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月6日(2001.11.6)

(86)国際出願番号 PCT/US00/12370

(87)国際公開番号 W000/68376

(87)国際公開日 平成12年11月16日(2000.11.16)

(31)優先権主張番号 09/307,307

(32)優先日 平成11年5月7日(1999.5.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/287,594

(32)優先日 平成12年3月28日(2000.3.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ジェネンテック・インコーポレーテッド
GENENTECH, INC.
アメリカ合衆国カリフォルニア・94080 - 4
990・サウス・サン・フランシスコ・ディー
エヌエー・ウェイ・1

(72)発明者 デサウベジ, フレドリック
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,
フォスター シティ, シューティング
スター アイランド 187

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なチンパンジーエリスロポエチン (C H E P O) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸

(57)【要約】

本発明は、単離された、新規なチンパンジーエリスロポエチン (C H E P O) ポリペプチドおよびこれらの C H E P O ポリペプチドをコードする、単離された核酸分子に関する。これらの単離された核酸配列を含むベクターおよび宿主細胞、異種タンパク質に融合された本発明の C H E P O ポリペプチドを含むキメラ分子、本発明の C H E P O ポリペプチドに結合する抗体、ならびに本発明の C H E P O ポリペプチドを生成する方法もまた提供される。

```

c1      MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLFVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAE
c1      *****
c1      MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLFVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAE
c1      NITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYANKRMEVQQAVEVWQGLALLSEA
c1      *****
c1      NITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYANKRMEVQQAVEVWQGLALLSEA
c1      VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAKKEAISPDP
c1      *****
c1      VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAKKEAISPDP
c1      AASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR
c1      *****
c1      AASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR

```

【特許請求の範囲】

【請求項1】 図2（配列番号3）のヌクレオチド1または約82から約579までを含む、単離された核酸分子。

【請求項2】 図2（配列番号3）のヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項3】 図2（配列番号2）の約1または約28から約193までのアミノ酸残基の配列をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項4】 図2（配列番号2）のアミノ酸残基1または約28から約193までを含む、単離されたポリペプチド。

【請求項5】 図2（配列番号3）のヌクレオチド配列からなる、単離された核酸分子。

【請求項6】 図2（配列番号2）のアミノ酸残基1または約28から約193からなる、単離されたポリペプチド。

【請求項7】 図2（配列番号3）のヌクレオチド1または約82から約579によってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項8】 異種アミノ酸配列に対して融合させられた、請求項4、6、または7のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む、キメラ分子。

【請求項9】 前記異種アミノ酸配列がエピトープタグ配列である、請求項8に記載のキメラ分子。

【請求項10】 前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンのFc領域である、請求項8に記載のキメラ分子。

【請求項11】 請求項4、6、または7のいずれか1項に記載のポリペプチドに対して特異的に結合する、抗体。

【請求項12】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項11に記載の抗体。

【請求項13】 前記抗体がヒト化抗体である、請求項11に記載の抗体。

【請求項14】 以下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：

【化1】

- (1) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
NSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACRT
GDR (SEQ ID NO:18);
- (2) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
NSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACRT
GDR (SEQ ID NO:19);
- (3) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
NSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACRT
GDR (SEQ ID NO:20);
- (4) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
NSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACRT
GDR (SEQ ID NO:21);
- (5) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
VNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACR
TGDR (SEQ ID NO:22);
- (6) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
VNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACR
TGDR (SEQ ID NO:23);
- (7) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
VNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACR
TGDR (SEQ ID NO:25);
- (8) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
VNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACR
TGDR (SEQ ID NO:26);
- (9) APPRLICDSRVLELYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNXSXQDAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLV
VNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACR
TGDR (SEQ ID NO:27);

(77がき)

- (10) APPRLICDSRVLEERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPTKVNIFYAWKRMENXTXAVEVWQGLALLSEAVLRGQALL
VNSSQPWEPLQLHYDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKIKLYTGEACR
TGDR (SEQ ID NO:28);
- (11) APPRLICDSRVLEERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPTKVNIFYAWKRMENXTXAVEVWQGLALLSEAVLRGQALL
VNSSQPWEPLQLHYDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKIKLYTGEACR
TGDR (SEQ ID NO:29);
- (12) APPRLICDSRVLEERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPTKVNIFYAWKRMENXSXVEVWQGLALLSEAVLRGQALLY
NSSQPWEPLQLHYDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKIKLYTGEACRT
GDR (SEQ ID NO:30);
- (13) APPRLICDSRVLEERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPTKVNIFYAWKRMENXSXVEVWQGLALLSEAVLRGQALLY
NSSQPWEPLQLHYDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKIKLYTGEACRT
GDR (SEQ ID NO:31); および
- (14) APPRLICDSRVLEERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITVPTKVNIFYAWKRMENXTXVEVWQGLALLSEAVLRGQALLY
NSSQPWEPLQLHYDKAVSGLRSLTLLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKIKLYTGEACRT
GDR (SEQ ID NO:33); ここで Xは、アロリンを除く任意のアミノ酸である。

【請求項15】 以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項14に記載のポリペプチド:

【化2】

- (1) MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILGDSRVLEHYLLEAKEAENITTTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNX
SXQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITAD
TFRKLFVYVSNFLRGKIKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:34);
- (2) MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILGDSRVLEHYLLEAKEAENITTTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNX
SXQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITAD
TFRKLFVYVSNFLRGKIKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:35);
- (3) MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILGDSRVLEHYLLEAKEAENITTTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNX
TXQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITAD
TFRKLFVYVSNFLRGKIKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:36);
- (4) MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILGDSRVLEHYLLEAKEAENITTTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRNX
TXQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITAD
TFRKLFVYVSNFLRGKIKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:37);
- (5) MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILGDSRVLEHYLLEAKEAENITTTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMN
XSXQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITAD
TFRKLFVYVSNFLRGKIKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:38);
- (6) MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILGDSRVLEHYLLEAKEAENITTTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMN
XSXQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAKKEAISPPDAASAAPLRTITAD
TFRKLFVYVSNFLRGKIKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:39);

【請求項18】 前記異種アミノ酸配列が免疫グロブリンのFc領域である、請求項16に記載のキメラ分子。

【請求項19】 請求項8、9、10、16、17、または18のいずれか1項に記載のキメラ分子をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項20】 請求項1、2、3、5、または19のいずれか1項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項21】 前記核酸分子が、ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識される制御配列に対して作動可能に連結されている、請求項20に記載のベクター。

【請求項22】 請求項20に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項23】 前記細胞がCHO細胞である、請求項22に記載の宿主細胞。

【請求項24】 前記細胞がE. coliである、請求項22に記載の宿主細胞。

【請求項25】 前記細胞が酵母細胞である、請求項22に記載の宿主細胞。

【請求項26】 ポリペプチドの発現に適切な条件下で請求項22に記載の宿主細胞を培養する工程、および該細胞培養物から該ポリペプチドを回収する工程を包含する、ポリペプチドを産生するためのプロセス。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、一般には、新規チンパンジーエリスロポエチンポリペプチド、それらのポリペプチドをコードする核酸分子の同定および単離、ならびにそれらポリペプチドの組換え産生に関連する。

【0002】**(発明の背景)**

赤血球形成、すなわち、赤血球の産生は、細胞の相殺を補うためにヒトの生涯を通じて持続的に起こる。赤血球形成は、適切な組織酸素化のために血中に十分な、しかし細胞の循環を妨げるほど多くはない数の赤血球を利用可能にする、非常に正確に制御された生理的機構である。赤血球の形成は骨髄で起こり、そしてホルモンであるエリスロポエチンの制御下にある。

【0003】

酸性糖タンパク質であるエリスロポエチンは、約34,000ダルトンの分子量であり、 α 、 β 、およびアシアロの3つの型で存在し得る。炭水化物成分がわずかに異なる α 型および β 型は、同じ有効性、生物学的活性、および分子量を有する。アシアロ型は、末端の炭水化物(シアル酸)が除去された、 α 型および β 型である。エリスロポエチンは、体が健康な状態にある時には血漿中に非常に低い濃度で存在する。ここでは組織は存在する数の赤血球から十分な酸素化を受けている。この正常な低い濃度が、通常加齢によって失われる赤血球の置換を刺激するに十分である。

【0004】

循環中のエリスロポエチン量は、循環中の血球による酸素輸送が減少したとき、低酸素状態下で増加する。低酸素は、出血による大量の血液の損失、照射への過剰曝露による赤血球の破壊、高い標高または長期化した意識不明状態による酸素取り込みの減少、または様々な形式の貧血によって起こり得る。低酸素ストレスを受けている組織へ応答して、エリスロポエチンは、骨髄の始原前駆体細胞の前赤芽球への変換を刺激することによって、赤血球の産生を増加させる。この前

赤芽球は続いて成熟し、ヘモグロビンを合成し、そして赤血球として循環中に放出される。循環中の赤血球の数が正常な組織酸素必要量に必要なものよりも多い場合、循環中のエリスロポエチンは減少する。

【0005】

エリスロポエチンは赤血球形成の過程に必要不可欠であるので、そのホルモンは、低いまたは不完全な赤血球産生によって特徴付けられる血液障害の診断および治療の両方に潜在的に有用な適用を有する。一般には、鎌状赤血球貧血の可能性のある治療におけるエリスロポエチンに関連する、Pennathur - Dasら、Blood 63(5):1168-71(1984)およびHaddy、Am. Jour. Ped. Hematol. Oncol. 4:191-196(1982)、およびエリスロポエチンが豊富な血漿の注入に対するインビボの応答に基づく、尿毒症ヒツジの治療レジメンを記載し、そして慢性腎不全に関連する型の貧血の調整策として、15~40日間1日あたり10U EOP/kgの投与量を提唱する、Eschbachら、J. Clin. Invest. 74(2):434-441(1984)を参照のこと。また、Krane、Henry Ford Hosp. Med. J. 31(3):177-181(1983)も参照のこと。

【0006】

本発明者らは本明細書中で、本明細書中でCHEPOと呼ばれる、チンパンジー由来の新規エリスロポエチンポリペプチドの同定および特徴付けを記載する。

【0007】

(発明の要旨)

ヒトエリスロポエチンをコードする核酸と相同性を有し、本出願において「CHEPO」と呼ばれる新規チンパンジーエリスロポエチンポリペプチドをコードするcDNAクローンが同定された。

【0008】

1つの実施形態では、本発明はCHEPOポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0009】

1つの局面では、単離された核酸分子は、(a)図3(配列番号(Seq ID No.)2および5)の、両端のアミノ酸を含めて約1または約28から約193までのアミノ酸残基の配列を有するCHEPOポリペプチドをコードするDNA分子、または(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0010】

別の局面では、単離された核酸分子は、(a)図3(配列番号2および5)の、両端のアミノ酸を含めて約1または約28から約193までのアミノ酸残基の配列を有するCHEPOポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または(b)(a)のヌクレオチド配列の相補鎖を含む。

【0011】

他の局面では、単離された核酸分子は、(a)図2(配列番号3)の、両端のアミノ酸を含めて約1または約82から約579までのヌクレオチド配列を有するDNA分子、または(b)(a)のDNA分子の相補鎖に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも

とも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0012】

別の局面では、単離された核酸分子は、(a)図2(配列番号3)の、両端のアミノ酸を含めて約1または約82から約579までのヌクレオチド配列、または(b)(a)のヌクレオチド配列の相補鎖を含む。

【0013】

別の局面では、本発明は図3(配列番号2および5)の、両端のアミノ酸を含めてアミノ酸1または約28から約193までをコードする核酸配列の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、下記で定義するように活性なCHEPオリゴペプチドをコードする、単離された核酸分子に関する。好ましくは、ハイブリダイゼーションはストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で起こる。

【0014】

さらに別の局面では、本発明は図2(配列番号3)の、両端のアミノ酸を含めて約ヌクレオチド1または約82と約579との間の、核酸配列の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、下記で定義するように活性なCHEPオリゴペプチドをコードする、単離された核酸分子に関する。好ましくは、ハイブリダイゼーションはストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で起こる。

【0015】

さらなる局面では、本発明は(a)図3(配列番号2および5)の、両端のアミノ酸を含めて約1または約28から約193までのアミノ酸残基の配列を有するCHEPOポリペプチドをコードするDNA分子、または(b)(a)のDNA分子の相補鎖と、ストリンジェントな条件下で試験DNA分子をハイブリダイズさせることによって、そしてもし試験DNA分子が(a)または(b)に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するなら、試験DNA分子を単離することによって産生された、単離された核酸分子に関する。

【0016】

別の局面では、本発明は(a)図3(配列番号2および5)の両端のアミノ酸を含めて約1または約28から193までのアミノ酸残基配列と比較した場合に、少なくとも約80%ポジティブ、あるいは少なくとも約81%ポジティブ、あるいは少なくとも約82%ポジティブ、あるいは少なくとも約83%ポジティブ、あるいは少なくとも約84%ポジティブ、あるいは少なくとも約85%ポジティブ、あるいは少なくとも約86%ポジティブ、あるいは少なくとも約87%ポジティブ、あるいは少なくとも約88%ポジティブ、あるいは少なくとも約89%ポジティブ、あるいは少なくとも約90%ポジティブ、あるいは少なくとも約91%ポジティブ、あるいは少なくとも約92%ポジティブ、あるいは少なくとも

も約93%ポジティブ、あるいは少なくとも約94%ポジティブ、あるいは少なくとも約95%ポジティブ、あるいは少なくとも約96%ポジティブ、あるいは少なくとも約97%ポジティブ、あるいは少なくとも約98%ポジティブ、そしてあるいは少なくとも約99%ポジティブでスコア付けされるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または(b)(a)のヌクレオチド配列の相補鎖を含む、単離された核酸分子に関する。

【0017】

特定の局面において、本発明は、N末端シグナル配列および/または開始メチオニンを欠くCHEPOポリペプチドをコードするDNAを含む単離された核酸分子、またはそのようなコードする核酸分子に相補的な、単離された核酸分子を提供する。シグナルペプチドは、図3(配列番号2および5)の配列における約アミノ酸位置1から約アミノ酸位置27まで伸長すると仮に同定された。しかし、シグナルペプチドのC末端の境界は変わり得るが、本明細書中で最初に同定されたシグナルペプチドC末端境界のどちら側にも約5アミノ酸のみである可能性が最も高いことが記載される。ここでシグナルペプチドのC末端境界は、そのような型のアミノ酸配列エレメントを同定するための、当該分野で慣用的に採用される基準に従って同定され得る(例えば、Nielsenら、Prot. Eng. 10:1-6(1997)およびvon Heinjeら、Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690(1986))。さらに、いくつかの場合には、分泌されたポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全には均一でなく、1つを超える分泌された種を生じることにも認識される。これらのポリペプチド、およびそれらをコードするポリヌクレオチドは、本発明によって企図される。そのために、本出願の目的のために、図3(配列番号2および5)に示したCHEPOポリペプチドのシグナルペプチドは、図3(配列番号2および5)のアミノ酸1からXまで伸長する。ここでXは図3(配列番号2および5)の23から32までの任意のアミノ酸である。従って、本発明によって含まれるCHEPOポリペプチドの成熟形態は、図3(配列番号2および5)のアミノ酸Xから193までを含むもの、および下記に記載するようなその改変体を含む。ここでXは図3(配列番号2および5)の23から32までの任意のアミノ酸である。

これらのポリペプチドをコードする、単離された核酸分子もまた企図される。

【0018】

別の実施形態は、例えばハイブリダイゼーションプローブとしての使用を見いだされ得るCHEPOポリペプチドコード配列のフラグメント、または必要に応じて抗CHEPO抗体への結合部位を含むポリペプチドをコードし得るCHEPOポリペプチドコードフラグメントに関する。そのような核酸フラグメントは、通常長さが少なくとも約20ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約30ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約40ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約50ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約60ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約70ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約80ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約90ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約100ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約110ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約120ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約130ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約140ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約150ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約160ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約170ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約180ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約190ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約200ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約250ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約300ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約350ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約400ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約450ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約500ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約600ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約700ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約800ヌクレオチド、あるいは長さが少なくとも約900ヌクレオチド、そしてあるいは長さが少なくとも約1000ヌクレオチドである。ここで、この文脈中で約という用語は、言及されたヌクレオチド配列の長さプラスまたはマイナスその言及された長さの10%を意味する。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列フラグメントは、図1(配列番号1)に示したヌクレオチド配列の任意のコード領域から得られる。CHEPOポリペプチドをコー

ドするヌクレオチド配列の新規フラグメントは、多くの任意の周知の配列整列プログラムを用いて、CHEPOポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、他の公知のヌクレオチド配列とを整列させ、そしてどのCHEPOポリペプチドをコードするヌクレオチド配列フラグメントが新規か決定することによって、慣用的な方法で決定し得ることが記載される。そのようなCHEPOポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は全て本明細書中で企図され、そして過度の実験なしに決定し得る。これらのヌクレオチド分子フラグメントによってコードされるCHEPOポリペプチドフラグメント、好ましくは抗CHEPO抗体への結合部位を含むCHEPOポリペプチドフラグメントも企図される。

【0019】

別の実施形態では、本発明は、CHEPOをコードするヌクレオチド配列またはその改変体を含むベクターを提供する。ベクターは、本明細書中上記で同定した任意の単離された核酸分子を含み得る。

【0020】

そのようなベクターを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞はCHO細胞、E. coli、または酵母であり得る。CHEPOポリペプチドを産生するためのプロセスがさらに提供され、そして宿主細胞をCHEPOの発現に適切な条件下で培養する工程、および細胞培養物からCHEPOを回収する工程を包含する。

【0021】

別の実施形態では、本発明は、本明細書中上記で同定された任意の単離された核酸配列によってコードされる、単離されたCHEPOポリペプチドを提供する。

【0022】

特定の局面では、本発明は単離されたネイティブな配列のCHEPOポリペプチドを提供する。それは特定の実施形態では、図3（配列番号2および5）の約1または約28から約193までの残基を含むアミノ酸配列を含む。

【0023】

別の局面では、本発明は、図3（配列番号2および5）の両端のアミノ酸を含

めて約1または約28から約193までのアミノ酸残基の配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたCHEPOポリペプチドに関する。

【0024】

さらなる局面では、本発明は、図3（配列番号2および5）の両端のアミノ酸を含めて約1または約28から約193までのアミノ酸残基配列と比較した場合に、少なくとも約80%ポジティブ、あるいは少なくとも約81%ポジティブ、あるいは少なくとも約82%ポジティブ、あるいは少なくとも約83%ポジティブ、あるいは少なくとも約84%ポジティブ、あるいは少なくとも約85%ポジティブ、あるいは少なくとも約86%ポジティブ、あるいは少なくとも約87%ポジティブ、あるいは少なくとも約88%ポジティブ、あるいは少なくとも約89%ポジティブ、あるいは少なくとも約90%ポジティブ、あるいは少なくとも約91%ポジティブ、あるいは少なくとも約92%ポジティブ、あるいは少なくとも約93%ポジティブ、あるいは少なくとも約94%ポジティブ、あるいは少なくとも約95%ポジティブ、あるいは少なくとも約96%ポジティブ、あるいは少なくとも約97%ポジティブ、あるいは少なくとも約98%ポジティブ、そ

してあるいは少なくとも約99%ポジティブでスコア付けされるアミノ酸配列を含む、単離されたCHEPOポリペプチドに関する。

【0025】

特定の局面では、本発明は、N末端シグナル配列および/または開始メチオニンを欠き、そして本明細書中上記に記載したようにそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる、単離されたCHEPOポリペプチドを提供する。それを産生するためのプロセスも本明細書中で記載され、ここでそれらのプロセスは、適切なコードする核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を、CHEPOポリペプチドの発現に適切な条件下で培養する工程、および細胞培養物からCHEPOポリペプチドを回収する工程を包含する。

【0026】

さらに別の局面では、本発明は図3（配列番号2および5）の両端のアミノ酸を含めて約1または約28から約193までのアミノ酸残基配列を含む、単離されたCHEPOポリペプチド、または生物学的に活性または抗CHEPO抗体の結合部位を提供するに十分なそのフラグメントに関する。ここで、生物学的活性を有するまたは抗CHEPO抗体の結合部位を提供するCHEPOポリペプチドフラグメントの同定は、当該分野において周知の技術を用いて慣用的な方法で達成され得る。好ましくは、CHEPOフラグメントは、ネイティブなCHEPOポリペプチドの定性的な生物学的活性を保持している。

【0027】

さらに別の局面では、本発明は(i)試験DNA分子をストリンジェントな条件下で、(a)図3（配列番号2および5）の両端のアミノ酸を含めて約1または約28から約193までのアミノ酸残基配列を有するCHEPOポリペプチドをコードするDNA分子、または(b)(a)のDNA分子の相補鎖とハイブリダイズさせること、そしてもし試験DNA分子が(a)または(b)に対して少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配

列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するなら、(ii)試験DNA分子を含む宿主細胞をポリペプチドの発現に適切な条件下で培養すること、そして(iii)細胞培養物からポリペプチドを回収することによって産生されたポリペプチドを提供する。

【0028】

別の実施形態では、本発明は異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列と融合したCHEPOポリペプチドを含むキメラ分子を提供する。ここで、CHEPOポリペプチドは、本明細書中上記に記載したような任意のCHEPOポリペプチド、改変体またはそのフラグメントを含み得る。そのようなキメラ分子の例は、エピトープタグ配列または免疫グロブリンのFc領域に融合したCHEPOポリペプチドを含む。

【0029】

別の実施形態では、本発明は、本明細書中上記に記載したようなCHEPOポリペプチドに特異的に結合する、下記で定義するような抗体を提供する。必要に応じて、抗体はモノクローナル抗体、抗体フラグメント、または単鎖抗体である。

【0030】

さらに別の実施形態では、本発明は下記で定義するような、ネイティブなCHEPOポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストに関する。特定の実施形態では、アゴニストまたはアンタゴニストは、抗CHEPO抗体または低分子である。

【0031】

さらなる実施形態では、本発明はCHEPOポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定する方法に関する。それは、CHEPOポリペプチドを候補分子と接触させる工程、およびこのCHEPOポリペプチドによって媒介される生物学的活性をモニターする工程を包含する。好ましくは、CHEPOポリペプチドはネイティブなCHEPOポリペプチドである。

【0032】

またさらなる実施形態では、本発明はCHEPOポリペプチド、あるいは本明細書中で記載したようなCHEPOポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト、あるいは抗CHEPO抗体を、キャリアと組み合わせて含む組成物に関連する。必要に応じて、キャリアは薬剤学的に受容可能なキャリアである。

【0033】

本発明の別の実施形態は、CHEPOポリペプチド、本明細書中で記載したようなそのアゴニストまたはアンタゴニスト、または抗CHEPO抗体に反応する状態の処置に有用な医薬品の調製のための、CHEPOポリペプチド、またはそのアゴニストもしくはアンタゴニスト、または抗CHEPO抗体の使用に関する。

【0034】

本発明のさらに別の実施形態は、ネイティブな配列のCHEPOポリペプチドと比較して、1つ以上のポリペプチド領域において、好ましくは図3（配列番号2および5）に示したCHEPOアミノ酸配列のアミノ酸位置84を囲む、および/または含む領域において、変化したグリコシル化パターンを有するCHEPOポリペプチドに関する。種々の実施形態で、CHEPO改変体ポリペプチドは、CHEPOポリペプチド配列のアミノ酸位置84に、またはその付近にN結合型グリコシル化部位またはO結合型グリコシル化部位を作製するように、周知の技術を用いて調製される。例えば、本発明によって企図されるCHEPOポリペプチドは、（a）図3（配列番号2および5）に示すCHEPOアミノ酸配列のアミノ酸81-84（すなわちMet-Glu-Val-Arg；配列番号6）が、アミノ酸配列Asn-X-Ser-X（配列番号7）またはAsn-X-Thr-X（配列番号8）で置換され（ここでXは、Pro以外の任意のアミノ酸

である) ; (b) 図3 (配列番号2および5) に示すCHEPOアミノ酸配列のアミノ酸82 - 85 (すなわちG l u - V a l - A r g - G l n ; 配列番号9) が、アミノ酸配列A s n - X - S e r - X (配列番号7) またはA s n - X - T h r - X (配列番号8) で置換され (ここでXは、P r o以外の任意のアミノ酸である) ; (c) 図3 (配列番号2および5) に示すCHEPOアミノ酸配列のアミノ酸83 - 86 (すなわちV a l - A r g - G l n - G l n ; 配列番号10) が、アミノ酸配列A s n - X - S e r - X (配列番号7) またはA s n - X - T h r - X (配列番号8) で置換され (ここでXは、P r o以外の任意のアミノ酸である) ; または (d) 図3 (配列番号2および5) に示すCHEPOアミノ酸配列のアミノ酸84 - 87 (すなわちA r g - G l n - G l n - A l a ; 配列番号11) が、アミノ酸配列A s n - X - S e r - X (配列番号7) またはA s n - X - T h r - X (配列番号8) で置換され (ここでXは、P r o以外の任意のアミノ酸である) 、それによってそれらの位置にN - グリコシル化部位を作製したポリペプチドを含む。これらの改変体ポリペプチドをコードする核酸も、それらの核酸を含むベクターおよび宿主細胞と同様に、本明細書中で企図される。

【0035】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

(I . 定義)

用語「CHEPOポリペプチド」「CHEPOタンパク質」、および「CHEPO」は、本明細書中で使用される場合には、ネイティブな配列のCHEPOおよびCHEPOポリペプチド改変体 (これらは本明細書中でさらに定義される) を含む。CHEPOポリペプチドは、種々の供給源から (例えば、ヒトの組織型から) または別の供給源から単離され得るか、あるいは組換えおよび / または合成方法によって調製され得る。

【0036】

「ネイティブな配列のCHEPO」は、天然に由来するCHEPOと同じアミノ酸配列を有しているポリペプチドを含む。このようなネイティブな配列のCHEPOは、天然から単離され得るか、または組換えおよび / もしくは合成手段によって産生され得る。用語「ネイティブな配列のCHEPO」は、CHEPOの

、天然に存在している短縮型または分泌された形態（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然に存在している改変体の形態（例えば、選択的にスプライシングされた形態）、および天然に存在している対立遺伝子改変体を特に含む。本発明の1つの実施形態においては、ネイティブな配列のCHEPOは、成熟のCHEPOであるか、または図3（配列番号2および5）のアミノ酸1から193を含む全長のネイティブな配列のCHEPOである。また、図3（配列番号2および5）に開示されているCHEPOポリペプチドは、アミノ酸位置1として本明細書中で示されているメチオニン残基で開始することが示されており、図3（配列番号2および5）のアミノ酸位置1の上流または下流のいずれかに配置された別のメチオニン残基が、CHEPOポリペプチドの開始アミノ酸残基として使用され得ることが考えられ得、そしてそのことが可能である。

【0037】

「CHEPO改変体ポリペプチド」は、以下のアミノ酸配列と少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有している、以下に定義されているような活性なCHEPOポリペプチドを意味する：（a）図3（配列番号2および5）に示されているCHEPOポリペプチドの残基1または約28から193、（b）図3（配列番号2および5）に示されているCHEPOポリペプチドのXから193（ここで、Xは、図3（配列番号2および5）の23から32までの任意のアミノ酸残基である）、または（c）図3（配列番号2および5）に示されているアミノ酸配列の別の特異的に誘導されたフラグメント。このようなCHEPO改変体ポリペプチドとしては、例えば、図3（配列番号2および5）の配列のN末端および/またはC末端、ならびに1つ以上の内部ドメイン中で、1つ以上のアミノ酸残基が付加されているか、または欠失しているCHEPOポリペプチドが挙げられる。通常は、CHEPO改変体ポリペプチドは、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約87%のアミノ酸配列同

一性、あるいは、少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは、少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そしてあるいは、少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を、以下に対して有する：(a) 図3(配列番号2および5)に示されているCHEPOポリペプチドの残基1または約28から193、(b) 図3(配列番号2および5)に示されているCHEPOポリペプチドのXから193(ここで、Xは、図3(配列番号2および5)の23から32までの任意のアミノ酸残基である)、または(c) 図3(配列番号2および5)に示されているアミノ酸配列の別の特異的に誘導されたフラグメント。CHEPO改変体ポリペプチドは、天然のCHEPOポリペプチド配列を含まない。通常は、CHEPO改変体ポリペプチドは、少なくとも約10アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約20アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約30アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約40アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約50アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約60アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約70アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約80アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約90アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約100アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約150アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約200アミノ酸の長さであり、あるいは、少なくとも約300アミノ酸の長さ以上である。

【0038】

本明細書中で同定されたCHEPOポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列のアラインメント、および必要である場合には、最大のパーセント配列同一性を達成するためのギャップの導入の後での、C

HEPO配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の割合として、そして配列同一性の一部としては任意の保存的置換は考慮せずに、定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当業者の範囲内である種々の方法において達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメーターを決定し得る。しかし、本明細書中での目的のためには、%アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して以下に記載されているように得られる。ここでは、ALIGN-2プログラムについての完全なソースコードが、以下の表1に提供される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって書かれており、そして表1に示されているソースコードは、米国商標庁(Washington D.C., 20559)においてユーザードキュメントとともに整理保管されている。ここでは、これは、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaを通じて公に入手可能であるか、または表1に提供されているソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム(好ましくは、デジタルUNIX(登録商標)V4.0D)上での使用のためにコンパイルされるはずである。全ての配列比較パラメーターが、ALIGN-2プログラムによって設定され、そして変化しない。

【0039】

本明細書中での目的のために、所定のアミノ酸配列Aの、所定のアミノ酸配列BとのまたはBに対する%アミノ酸配列同一性(これは、所定のアミノ酸配列BとまたはBに対して特定の%アミノ酸配列同一性を有するかまたは%アミノ酸配列同一性を含む所定のアミノ酸配列Aとして別に記載され得る)は、以下のよう

に計算される：

割合 X / Y の 100 倍

ここでは、 X は、 A および B のアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラム `ALIGN - 2` によって同一性適合としてスコア付けされたアミノ酸残基の数である。そしてここでは、 Y は、 B 中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは等しくない場合には、 B に対する A の %アミノ酸配列同一性は、 A に対する B の %アミノ酸配列同一性とは等しくないことが明らかである。%アミノ酸配列同一性の計算の例として、以下の表 2 および表 3 は、`PRO` と命名されたアミノ酸配列に対する、`Comparison Protein` と命名されたアミノ酸配列の %アミノ酸配列同一性を計算するための方法を示す。

【0040】

他に特に記載されていない限りは、本明細書中で使用される全ての %アミノ酸配列同一性の値は、`ALIGN - 2` 配列比較コンピュートプログラムを使用して上記のように得られる。しかし、%アミノ酸配列同一性はまた、配列比較プログラム `NCBI - BLAST2` (`Altschul`ら、`Nucleic Acids Res.`, 25:3389-3402 (1997)) を使用して決定され得る。`NCBI - BLAST - 2` 配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> からダウンロードされ得るか、またはそうでなければ、`National Institute of Health, Bethesda, MD` から得ることができる。`NCBI - BLAST2` は、いくつかの検索パラメーターを使用する。ここでは、例えば以下を含む、全てのこれらの検索パラメーターは、デフォルト値に設定される：マスクされていない = `yes`、鎖 = 全て、予想される出現 = 10、最低の複雑性の長さ = 15 / 5、`multi-pass` 値 = 0.01、`multi-pass` の定数 = 25、最終的なギャップアラインメントについてのドロップオフ = 25、およびスコアリングマトリックス = `BLOSUM62`。

【0041】

アミノ酸配列の比較のために `NCBI - BLAST2` が使用される状況におい

ては、所定のアミノ酸配列Aの、所定のアミノ酸配列BとのまたはBに対する%アミノ酸配列同一性(これは、所定のアミノ酸配列BとまたはBに対して特定の%アミノ酸配列同一性を有するかまたは%アミノ酸配列同一性を含む所定のアミノ酸配列Aとして別に記載され得る)は、以下のように計算される:

割合X/Yの100倍

ここでは、Xは、AおよびBのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2によって同一性適合としてスコア付けされたアミノ酸残基の数である。そしてここでは、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合には、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性とは等しくないことが明らかである。

【0042】

「CHEPO改変体ポリヌクレオチド」、またはCHEPO改変体核酸配列は、以下に定義されているような活性なCHEPOポリペプチドをコードし、そして以下のいずれかと少なくとも約80%の核酸配列同一性を有している核酸分子を意味する:(a)図3(配列番号2および5)に示されているCHEPOポリペプチドの残基1または約28から193をコードする核酸配列、(b)図3(配列番号2および5)に示されているCHEPOポリペプチドの残基Xから193をコードする核酸配列(ここで、Xは、図3(配列番号2および5)の23から32までの任意のアミノ酸残基である)、または(c)図3(配列番号2および5)に示されているアミノ酸配列の別の特異的に誘導されたフラグメントをコードする核酸配列。通常は、CHEPO改変体ポリペプチドは、(a)図3(配列番号2および5)に示されているCHEPOポリペプチドの残基1または約28から193をコードする核酸配列、(b)図3(配列番号2および5)に示されているCHEPOポリペプチドの残基Xから193をコードする核酸配列(ここで、Xは、図3(配列番号2および5)の23から32までの任意のアミノ酸残基である)、または(c)図3(配列番号2および5)に示されているアミノ酸配列の別の特異的に誘導されたフラグメントをコードする核酸配列のいずれかと、少なくとも80%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約81%の核

酸配列同一性、あるいは、少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは、少なくとも約98%の核酸配列同一性、そしてあるいは、少なくとも約99%の核酸配列同一性を有する。CHEPOポリヌクレオチド改変体は、ネイティブなCHEPOのヌクレオチド配列を含まない。

【0043】

通常は、CHEPO改変体ポリヌクレオチドは、少なくとも約30ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約60ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約90ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約120ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約150ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約180ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約210ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約240ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約270ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約300ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約450ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約600ヌクレオチドの長さ、あるいは、少なくとも約900ヌクレオチド以上の長さである。

【0044】

本明細書中で同定されたCHEPOポリペプチドをコードする核酸配列に関する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列のアラインメント、および必要である場合には、最大のパーセント配列同一性を達成するためのギャップの導入

の後での、CHEPO配列をコードする核酸配列中のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドの割合として同定される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当業者の範囲内である種々の方法において達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメーターを決定し得る。しかし、本明細書中での目的のためには、%核酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータープログラムALIGN-2を使用することによって以下に記載されているように得られる。ここでは、ALIGN-2プログラムについての完全なソースコードが、以下の表1に提供される。ALIGN-2配列比較コンピュータープログラムは、Genentech, Inc.によって書かれており、そして表1に示されているソースコードは、米国商標庁(Washington D.C., 20559)においてユーザードキュメントとともに整理補完されている。ここでは、これは、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc. South San Francisco, Californiaを通じて公に入手可能であるか、または表1に提供されているソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム(好ましくは、デジタルUNIX(登録商標) V4.0D)上での使用のためにコンパイルされるはずである。全ての配列比較パラメーターが、ALIGN-2プログラムによって設定され、そして変化しない。

【0045】

本明細書中での目的のために、所定の核酸配列Cの、所定の核酸配列DとのまたはDに対する%核酸配列同一性(これは、所定の核酸配列DとまたはDに対して特定の%核酸配列同一性を有するかまたは%核酸配列同一性を含む所定の核酸配列Cとして記載され得る)は、以下のように計算される:

割合W/Zの100倍

ここでは、Wは、CおよびDのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムALIGN-2によって同一性適合としてスコア付けされたヌクレオチドの数である。そしてここでは、Zは、D中のヌクレオチドの総数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さとは等しくない場合には、Dに対するCの%核酸配列同一性は、Cに対するDの%核酸配列同一性とは等しくないことが明らかである。%核酸配列同一性の計算の例として、以下の表4および表5は、PROと命名された核酸配列に対する、Comparison DNAと命名された核酸配列の%核酸配列同一性を計算するための方法を示す。

【0046】

他に特に記載されていない限りは、本明細書中で使用される全ての%核酸配列同一性の値は、ALIGN-2配列比較コンピュータープログラムを使用して上記のように得られる。しかし、%核酸配列同一性はまた、配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschulら、Nucleic Acids Res., 25:3389-3402(1997))を使用して決定され得る。NCBI-BLAST-2配列比較プログラムは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>からダウンロードされ得るか、またはそうでなければ、National Institute of Health, Bethesda, MDから得ることができる。NCBI-BLAST2は、いくつかの検索パラメーターを使用する。ここでは、例えば以下を含む、全てのこれらの検索パラメーターは、デフォルト値に設定される：マスクされていない=yes、鎖=全て、予想される出現=10、最低の複雑性の長さ=15/5、multi-pass値=0.01、multi-passの定数=25、最終的なギャップアラインメントについてのドロップオフ=25、およびスコアリングマトリックス=BLOSUM62。

【0047】

配列の比較のためにNCBI-BLAST2が使用される状況においては、所定の核酸配列Cの、所定の核酸配列DとのまたはDに対する%核酸配列同一性(これは、所定の核酸配列DとまたはDに対して特定の%核酸配列同一性を有するかまたは%核酸配列同一性を含む所定の核酸配列Cとして別に記載され得る)は

、以下のように計算される：

割合W / Zの100倍

ここでは、Wは、CおよびDのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムNCBI - BLAST2によって同一性適合としてスコア付けされたヌクレオチドの数である。そしてここでは、Zは、D中のヌクレオチドの総数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さと等しくない場合には、Dに対するCの%核酸配列同一性は、Cに対するDの%核酸配列同一性とは等しくないことが明らかである。

【0048】

他の実施形態においては、CHEPO変体ポリヌクレオチドは、活性なCHEPOポリペプチドをコードする核酸分子であり、そしてこれは、図3（配列番号2および5）に示されている全長のCHEPOポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して、（好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で）ハイブリダイズし得る。CHEPO変体ポリペプチドは、CHEPO変体ポリヌクレオチドによってコードされるものであり得る。

【0049】

用語「ポジティブ」は、上記のように行われるアミノ酸配列の同一性の比較の状況においては、同一ではないが同様の特性を有する、比較される配列中のアミノ酸残基を含む。目的のアミノ酸残基に対してポジティブな値をスコア付けするアミノ酸残基は、目的のアミノ酸残基に対して同一であるか、または目的のアミノ酸残基の好ましく置換されたもの（以下の表6において定義されている）であるかのいずれかである。

【0050】

本明細書中での目的のためには、所定のアミノ酸配列Aの、所定のアミノ酸配列BとのまたはBに対するポジティブの%値（これは、所定のアミノ酸配列BとまたはBに対して特定の%ポジティブを有するかまたは%ポジティブを含む所定のアミノ酸配列Aとして別に記載され得る）は、以下のように計算される：

割合X / Yの100倍

ここでは、Xは、AおよびBのアラインメントをプログラムしている配列アラインメントプログラムALIGN-2によって、上記に定義されているようなポジティブ値をスコア付けするアミノ酸残基の数である。そしてここでは、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと同じでない場合には、Bに対するAの%ポジティブは、Aに対するBの%ポジティブとは等しくないことが明らかである。

【0051】

本明細書中に開示されている種々のポリペプチドを記載するために使用される場合は、「単離された」は、同定されており、そしてその天然の環境の成分から分離されているおよび/または回収されているポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、それが天然に関連している全ての成分と関連していない。その天然の環境の混入成分は、代表的には、ポリペプチドについての診断的な使用または治療的な使用を妨害する材料であり、そしてこの成分としては、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性の溶質または非タンパク質性の溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態においては、ポリペプチドは、(1)スピニングキャップシークエネーターの使用によってN末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るために十分な程度まで、あるいは(2)クマシーブル(好ましくは、銀染色)を使用して非還元条件または還元条件下でのSDS-PAGEによる均質まで、精製される。単離されたポリペプチドとしては、は組換え細胞中でのインサイチュのポリペプチドが挙げられる。なぜなら、CHEPOの天然の環境の少なくとも1つの成分は存在しないからである。しかし、通常は、単離されたポリペプチドは、少なくとも1つの精製工程によって調製される。

【0052】

CHEPOポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、同定され、そして通常はCHEPOをコードする核酸の天然の供給源に関連している少なくとも1つの混入核酸分子から分離されている核酸分子である。好ましくは、単離された核酸は、天然に関連している全ての成分と関連していない。単離されたCHEPOをコードする核酸分子は、天然に見出される形態またはセッティング以

外である。従って、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する場合には、CHEPOをコードする核酸分子とは区別される。しかし、CHEPOポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、通常はCHEPOを発現する細胞中に含まれるCHEPOをコードする核酸分子を含む。ここでは、例えば、核酸分子は、天然の細胞のものとは異なる染色体位置に存在する。

【0053】

用語「制御配列」は、特定の宿主生物体中に作動可能に連結されたコード配列の発現のために必要なDNA配列をいう。原核生物に適切な制御配列としては、例えば、プロモーター、必要に応じて、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位が挙げられる。真核生物細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが公知である。

【0054】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係で配置される場合には、「作動可能に連結される」。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与しているプレタンパク質として発現される場合には、ポリペプチドのDNAに作動可能に連結される；プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与える場合には、コード配列に対して作動可能に連結される；あるいは、リボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするように配置される場合には、コード配列に対して作動可能に連結される。一般には、「作動可能に連結される」は、連結されるDNA配列が連続しており、そしてこのDNA配列が、分泌リーダーの場合には連続しておりそしてリーディングフレーム内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは、連続している必要はない。連結は、便利な制限部位での連結によって達成される。このような部位が存在しない場合には、合成のオリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の実行に従って使用される。

【0055】

用語「抗体」は、最も広い意味において使用され、そして例えば、単一の抗CHEPOモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、および中和抗体を含む）、ポリペプチド特異性を有する抗CHEPO抗体組成物、単鎖抗CHEP

O抗体、および抗CHEPO抗体のフラグメントを含む(下記を参照のこと)。
用語「モノクローナル抗体」は、本明細書中で使用される場合には、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を言う。すなわち、微量で存在し得る可能性のある天然に存在している変異体を除く、個々の抗体を含む集団は同一である。

【0056】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般には、プローブの長さ、洗浄温度、および塩濃度に依存して、経験的に計算される。一般には、より長いプローブは、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、一方、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般には、相補鎖がそれらの融解温度未満の環境に存在する場合には、変性DNAが再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズが可能な配列との間でのより高い程度の相同性が所望されるほど、より高い相対的な温度が使用され得る。結果として、より高い相対的な温度が、反応条件をよりストリンジェントにする傾向にあり、一方、より低い温度はストリンジェントをより低くする傾向にあることが理解される。ハイブリダイゼーション反応のさらなる詳細およびストリンジェンシーの説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

【0057】

「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシーの条件」は、本明細書中で定義される場合には、以下によって同定され得る：(1)洗浄(例えば、50 で、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム)のために、低いイオン強度および高温を使用すること；(2)ハイブリダイゼーションの間に、ホルムアミドのような変性剤(例えば、42 で、0.1%のウシ血清アルブミンを有している50%(v/v)ホルムアミド/0.1%のFicoll/0.1%のポリビニルピロリドン/750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウムを有する50mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5))を使用すること；(3)

42 で、50%のホルムアミド、5×SSC(0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA(50g/ml)、0.1%のSDS、および10%のデキストラン硫酸を使用し、42 での0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)、および55 での50%のホルムアミドでの洗浄を伴い、続く55 でのEDTAを含有する0.1×SSCから構成される高ストリンジェンシーの洗浄を伴うこと。

【0058】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989に記載されているように同定され得、そしてこれは、上記のようなような低いストリンジェントの洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度、および%SDS)の使用を含む。中程度のストリンジェントな条件の一例は、20%のホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×デンハルト溶液、10%のデキストラン硫酸、および20mg/mlの変性切断サケ精子DNAを含有する溶液中での37 で一晩のインキュベーション、続く約37~50 での1×SSC中でのフィルターの洗浄である。当業者は、プローブの長さなどの因子に順応させるために必要である場合には、温度、イオン強度などを調節する方法を認識している。

【0059】

用語「エピトープ(で)タグ化(した)」は、本明細書中で使用される場合には、「タグポリペプチド」に対して融合されたCHEPOポリペプチドを含むキメラポリペプチドをいう。タグポリペプチドは、それに対して抗体が作製され得るが、なおそれに対して融合されるポリペプチドの活性を妨害しないように十分に短いエピトープを提供するために十分な残基を有する。タグポリペプチドはまた、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応しないように、かな

り特有である。適切なタグポリペプチドは、一般には、少なくとも6個のアミノ酸残基を有し、そして通常は、約8個～50個の間のアミノ酸残基（好ましくは、約10個～20個の間のアミノ酸残基）を有する。

【0060】

本明細書中で使用される場合には、「イムノアドヘシン (immuno adhesionin)」は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能と異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性を組合せる、抗体様分子をいう。構造的には、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識部位および抗原結合部位以外である（すなわち、「異種」である）所望される結合特異性を有しているアミノ酸配列と、免疫グロブリンの定常ドメイン配列との融合体を含む。イムノアドヘシンの接着部分は、代表的には、レセプターまたはリガンドの少なくとも結合部位を含む連続しているアミノ酸配列である。イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン（例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3、またはIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1およびIgA-2を含む）、IgE、IgD、またはIgM）から得ることができる。

【0061】

本明細書中で目的については、「活性な」または「活性」は、ネイティブの、または天然に存在しているCHEPOの生物学のおよび/または免疫学的活性を保持しているCHEPOの形態をいう。ここでは、生物学活性は、ネイティブのまたは天然に存在しているCHEPOによって保有される抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力以外の、ネイティブのまたは天然に存在しているCHEPOによって引き起こされる生物学機能（阻害または刺激のいずれか）をいう。そして、免疫学的活性は、ネイティブのまたは天然に存在しているCHEPOによって保有される抗原性エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力をいう。好ましい生物学活性としては、例えば、赤血球の産生を調節する能力、骨髄および/または他の造血組織の方向付けられた先祖細胞の表面上のレセプターに結合する能力、ならびに/あるいは、赤血球の増殖および/または最終的な成熟を誘導する能力が挙げられる。

【0062】

用語「アンタゴニスト」は、最も広い意味で使用され、そして本明細書中で開示されるネイティブなCHEPOポリペプチドの生物学的活性を、部分的または完全にブロックする、阻害する、または中和する任意の分子を含む。同様の意味において、用語「アゴニスト」は、最も広い意味で使用され、そして本明細書中で開示されるネイティブなCHEPOポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。適切なアゴニストまたはアンタゴニスト分子としては、特に、アゴニストもしくはアンタゴニスト抗体もしくは抗体フラグメント、またはネイティブなCHEPOポリペプチドのフラグメントもしくはアミノ酸配改変体、ペプチド、低有機分子などが挙げられる。CHEPOポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを同定するための方法は、CHEPOポリペプチドを候補のアゴニストまたはアンタゴニスト分子と接触させる工程、およびCHEPOポリペプチドと通常は関連した1つ以上の生物学的活性の検出可能な変更を測定する工程を包含し得る。

【0063】

「処置」は、治療的処置、および予防的 (prophylactic) または予防的 (preventive) 措置 (measure) の両方をいう。ここでは、目的は、標的化された病理学的状態または障害を予防することまたは遅らせる (軽減する) ことである。処置を必要としている者は、すでに障害を有している者、障害を有する傾向にある者、および障害が予防されている者を含む。

【0064】

「慢性的な」投与は、延長された期間の最初の治療効果 (活性) を最大にするように、急速な態様とは対照的に、持続的な態様での薬剤の投与をいう。断続的な投与は、中断を伴わずに連続的には行われませんが、むしろ本質的には周期的である処置である。

【0065】

処置の目的について「哺乳動物」は、哺乳動物 (ヒト、飼育動物 (domestic animal)、および家畜動物を含む)、および動物園の動物、変種 (sport)、またはペット動物 (例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウサギなど) として分類される任意の動物をいう。好ましくは、

哺乳動物はヒトである。

【0066】

1つ以上のさらなる治療剤「と組合せた」投与は、同時の（並行して）および任意の順序での連続的な投与を含む。

【0067】

「キャリア」は、本明細書中で使用される場合には、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤を含む。これらは、使用される投与量および濃度では、それに対して暴露される細胞または哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に受容可能なキャリアは、しばしば、水性のpH緩衝化された溶液である。生理学的に受容可能なキャリアの例としては、以下が挙げられる：緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、および他の有機酸の緩衝液）；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；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；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；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）；モノサッカライド、ジサッカライド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトール、またはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；および/または非イオン性境界活性剤（例えば、TWEEN、ポリエチレングリコール（PEG）、およびPLURONICS）。

【0068】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント；ダイアボディー（diabody）；直鎖状の抗体（Zapataら、Protein Eng., 8(10):1057-1062(1995)）；単鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成された多重特異的抗体が挙げられる。

【0069】

抗体のパパイン消化によって、2つの同一の抗原結合フラグメント（「Fab

」フラグメントと呼ばれる)が生じる。これらのそれぞれが、単一の抗原結合部位および残りの「Fc」(これは、容易に結晶化する能力を反映する名称である)フラグメントを有する。ペプシン処理によって、2つの抗原結合部位を有し、そしてなお抗原を架橋し得る $F(ab')_2$ フラグメントを生じる。

【0070】

「Fv」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最少の抗体フラグメントである。この領域は、密接な共有結合していない、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体から構成される。この立体配置においては、それぞれの可変ドメイン中の3つのCDRが、 $V_H - V_L$ 二量体の表面上での抗原結合部位を定義するように相互作用する。全部で6個のCDRが、抗体に対して抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的な3個のCDRのみを含むFvの半分)が、抗原を認識しそして結合する能力を有するが、完全な結合部位よりも親和性が低い。

【0071】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の最初の定常ドメイン(CH1)を含む。Fabフラグメントは、抗体ヒンジ領域に由来する1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加によってFabフラグメントとは異なる。Fab'-SHは、Fab'についての本明細書中の名称である。ここでは、定常ドメインのシステイン残基は、フリーのチオール基を保有している。 $F(ab')_2$ 抗体フラグメントは、通常は、それらの間にヒンジシステインを有するFab'フラグメントの対として産生された。抗体フラグメントの他の化学的なカップリングもまた、公知である。

【0072】

任意の脊椎動物種に由来する抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、およびと呼ばれる、2つの明らかに異なる型の1つに割り当てられ得る。

【0073】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、免疫グロブリンは異

なるクラスに割り当てられ得る。免疫グロブリンの5個の主要なクラスが存在する：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM。そしてこれらのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2)にさらに分類され得る。

【0074】

「単鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントは、抗体のVHドメインおよびVLドメインを含む。ここでは、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、Fvポリペプチドはさらに、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーを含む。これによって、sFvが抗原結合のために所望される構造を形成することが可能となる。sFvの総説については、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第113巻、Rosenburg and Moore編、Springer-Verlag、New York、269-315頁(1994)。

【0075】

用語「ダイアボディー(diabody)」は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体フラグメントをいう。これらのフラグメントは、同じポリペプチド鎖(VH-VL)中で、軽鎖可変ドメイン(VL)に対して連結された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインが、別の鎖の相補ドメインと対合するように強制し、そして2つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディーは、例えば、第EP 404,097号;第WO93/11161号;およびHollingerら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、90:6444-6448(1993)により完全に記載されている。

【0076】

「単離された」抗体は、同定され、そしてその天然の環境の成分から分離および/または回収されている抗体である。その天然の環境の混入成分は、抗体の診断的または治療的な使用を妨害する材料であり、そしてこれらの成分としては、酵素、ホルモン、および他のタンパク質様または非タンパク質様の溶質が挙げら

れ得る。好ましい実施形態においては、抗体は、Lowry法によって決定されるような抗体の95重量%以上を超えるまで、そして最も好ましくは、99重量%を超えるまで、(2)スピニングキャップシークエネーターの使用によってN末端および内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るために十分な程度まで、あるいは(3)クマシーブル(好ましくは、銀染色)を使用して還元条件または非還元条件下でのSDS-PAGEによる均質まで、精製される。単離された抗体としては、組換え細胞中でのインサイチュの抗体が挙げられる。なぜなら、抗体の天然の環境の少なくとも1つの成分は存在しないからである。しかし、通常は、単離された抗体は、少なくとも1つの精製工程によって調製される。

【0077】

用語「標識」は、本明細書中で使用される場合には、検出可能である化合物または組成物をいう。これは、「標識された」抗体を生成するように、抗体に対して直接または間接的に結合される。標識は、それ自体によって検出可能(例えば、放射性同位元素または蛍光標識)であり得るか、あるいは酵素標識の場合においては、検出可能である基質化合物または組成物の化学的な変化を触媒し得る。

【0078】

「固相」によって、それに対して本発明の抗体が接着し得る非水性のマトリックスが意味される。本明細書中に含まれる固相の例としては、部分的または全体が、ガラス(例えば、制御された孔ガラス)、ポリサッカライド(例えば、アガロース)、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール、およびシリコンから形成されるものが挙げられる。特定の実施形態においては、状況に依存して、固相は、アッセイプレートのウェルを含み得る;他のものでは、精製カラム(例えば、アフィニティー精製カラム)である。この用語はまた、離散性の粒子の不連続な固相(例えば、米国特許第4,275,149号に記載されているもの)をも含む。

【0079】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質、および/または境界活性剤の、小さい小胞化合物である。これは、哺乳動物への薬物(例えば、CHEPOポリペプチドまたはそれに対する抗体)の送達に有用である。リポソームの成分は

、生物学的な膜の脂質の組み合わせ (a r r a n g e) と同様に、二重層の形成
において共通して準備される。

【 0 0 8 0 】

低分子は、約500ダルトン未満の分子量を有するとして、本明細書中で定義
される。

【 0 0 8 1 】

【表1】

表1

```

/*
.
* C-C increased from 12 to 15
5 * Z is average of EQ
* B is average of MD
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M -8 /* value of a match with a stop */
10
int _day(26[26]) = {
/* A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ {2,0,2,0,0,4,1,-1,0,-1,-2,1,0,_M,1,0,2,1,1,0,0,8,0,3,0},
/* B */ {0,3,-4,3,2,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,2,_M,-1,1,0,0,0,0,-2,-5,0,-3,1},
15 /* C */ {-2,-4,15,-5,-4,-3,-3,-2,0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4,0,-2,0,-2,-8,0,0,-5},
/* D */ {0,3,-5,4,3,-8,1,1,-2,0,0,-4,-3,2,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,2},
/* E */ {0,2,-5,3,4,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,1,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,3},
/* F */ {-4,-5,-4,-6,-5,-9,-5,-2,1,0,-5,2,0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3,0,-1,0,0,7,-5},
/* G */ {1,0,-3,1,0,-5,5,-2,-3,0,-2,-4,-3,0,_M,-1,-1,-3,1,0,0,-1,-7,0,-5,0},
20 /* H */ {-1,1,-3,1,1,-2,-2,6,-2,0,0,-2,-2,2,_M,0,3,2,-1,-1,0,-2,-3,0,0,2},
/* I */ {-1,-2,-2,-2,1,-3,-2,5,0,-2,2,2,-2,_M,-2,-2,-2,-1,0,0,4,-5,0,-1,-2},
/* J */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* K */ {-1,0,-5,0,0,-5,-2,0,-2,0,5,-3,0,1,_M,-1,1,3,0,0,0,-2,-3,0,-4,0},
/* L */ {-2,-3,-6,-4,-3,2,-4,-2,2,0,-3,6,4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1,0,2,-2,0,-1,-2},
25 /* M */ {-1,-2,-5,-3,-2,0,-3,-2,2,0,0,4,6,-2,_M,-2,-1,0,-2,-1,0,2,4,0,-2,-1},
/* N */ {0,2,-4,2,1,4,0,2,-2,0,1,-3,-2,2,_M,-1,1,0,1,0,0,-2,-4,0,-2,1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1,0,-2,0,-1,-3,-2,-1,_M,6,0,0,1,0,0,-1,-6,0,-5,0},
/* Q */ {0,1,-5,2,2,-5,-1,3,-2,0,1,-2,-1,1,_M,0,4,1,-1,-1,0,-2,-5,0,-4,3},
30 /* R */ {-2,0,-4,-1,-1,-4,-3,2,-2,0,3,-3,0,0,_M,0,1,6,0,-1,0,-2,2,0,-4,0},
/* S */ {1,0,0,0,0,-3,1,-1,-1,0,0,-3,-2,1,_M,1,-1,0,2,1,0,-1,-2,0,-3,0},
/* T */ {1,0,-2,0,0,-3,0,-1,0,0,0,-1,-1,0,_M,0,-1,-1,1,3,0,0,-5,0,-3,0},
/* U */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* V */ {0,2,-2,-2,-2,-1,-1,-2,4,0,-2,2,-2,_M,-1,-2,-2,-1,0,0,4,6,0,-2,-2},
35 /* W */ {-6,-5,-8,-7,-7,0,-7,-3,-5,0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5,2,-2,-5,0,-6,17,0,0,-6},
/* X */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0}

```

表1(つがき)

```

/* Y */ {3,3,0,4,4,7,5,0,1,0,4,1,2,2,_M,5,4,4,3,3,0,2,0,0,10,4},
/* Z */ {0,1,5,2,3,5,0,2,2,0,0,2,1,1,_M,0,3,0,0,0,2,6,0,4,4}
};

```

表1(つがき)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
5 #include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
10 #define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINSO 8 /* penalty for a gap */
15 #define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINSO 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
20     short n(MAXJMP); /* size of jmp (neg for del) */
     unsigned short x(MAXJMP); /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16-1 */

struct diag {
25     int score; /* score at last jmp */
     long offset; /* offset of prev block */
     short ijmp; /* current jmp index */
     struct jmp jp; /* list of jmps */
};

30 struct path {
     int spc; /* number of leading spaces */
     short n(JMPS); /* size of jmp (gap) */
     int x(JMPS); /* loc of jmp (last elem before gap) */
35 };

```

表1(フツキ)

	char	*ofile;	/* output file name */
	char	*names[2];	/* seq names: getseqs() */
	char	*prog;	/* prog name for err msgs */
	char	*seqs[2];	/* seqs: getseqs() */
5	int	dmax;	/* best diag: nw() */
	int	dmax0;	/* final diag */
	int	dna;	/* set if dna: main() */
	int	endgaps;	/* set if penalizing end gaps */
	int	gapx, gapy;	/* total gaps in seqs */
10	int	len0, len1;	/* seq lens */
	int	ngapx, ngapy;	/* total size of gaps */
	int	smax;	/* max score: nw() */
	int	*xbm;	/* bitmap for matching */
	long	offset;	/* current offset in jmp file */
15	struct	diag *dx;	/* holds diagonals */
	struct	path pp[2];	/* holds path for seqs */
	char	*calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();	
	char	*getseq(), *g_calloc();	
20			

表1(つづき)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: prog file1 file2
5  * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
1.0 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
15 #include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
20   1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0

static _nbval[26] = {
   1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
25   128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
   1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
   1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
   };

main(ac, av)                                main
30     int   ac;
     char  *av[];

     {
     prog = av[0];
     if (ac != 3) {
35         fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
         fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");

```

表 1 (つぎ)

```

    fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
    fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
    fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
    exit(1);
5   }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
10   xbm = (dna)?_dbval:_pbval;

    endgaps = 0;           /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";  /* output file */

15   nw();                 /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjumps();          /* get the actual jumps */
    print();              /* print stats, alignment */

    cleanup();           /* unlink any tmp files */
20  }

```

表1(つづき)

```

/* do the alignment, return best score: main()
   * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
   * pro: PAM 250 values
5   * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
   * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
   * to a gap in seq y.
   */
nw()
10 {
    char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely; /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;   /* keep track of delx */
    int       *tmp;         /* for swapping row0, row1 */
15    int       mis;         /* score for each type */
    int       ins0, ins1;    /* insertion penalties */
    register  id;           /* diagonal index */
    register  ij;           /* jmp index */
    register  *col0, *col1; /* score for curr, last row */
20    register  xx, yy;      /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
25    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
30    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] - ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] - col0[yy-1] - ins1;
35            ndely[yy] = yy;
        }
    }

```

表1(つづき)

```

col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
5         del[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
10     /* initialize first entry in col
*/
    if (endgaps) {
        if (xx == 1)
            col1[0] = delx - (ins0 + ins1);
15         else
            col1[0] = delx - col0[0] - ins1;
        ndelx = xx;
    }
    else {
20         col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
    }
}

```

表 1 (つぎ)

```

...NW
for (py = seq[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
5     if (dna)
        mis += (xbrn["px-A"]&xbrn["py-A"])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day["px-A"]*py-'A';

10     /* update penalty for del in x seq;
        * favor new del over ongoing del
        * ignore MAXGAP if weighting endgaps
        */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
15         if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0 + ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
20             ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0 + ins1) >= dely[yy]) {
25             dely[yy] = col0[yy] - (ins0 + ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

30     /* update penalty for del in y seq;
        * favor new del over ongoing del
        */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
35         if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0 + ins1);
            ndelx = 1;
        }
    }
}

```

表1 (つぎ)

```
    } else {  
        delx -= ins1;  
        ndelx++;  
    }  
5    } else {  
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {  
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);  
            ndelx = 1;  
        } else  
10        ndelx++;  
    }  
  
/* pick the maximum score; we're favoring  
* mis over any del and delx over dely  
15 */
```

20

25

表1(つづき)

```

...NW
id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis > - delx && mis > - dely[yy])
5     col[yy] = mis;
else if (delx > - dely[yy]) {
     col[yy] = delx;
     ij = dx[id].ijmp;
     if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx > - MAXJMP
10     && xx > dx[id].jp.x[i]+MX) || mis > dx[id].score+DINSG)) {
         dx[id].ijmp++;
         if (++ij > - MAXJMP) {
             writeimps(id);
             ij = dx[id].ijmp - 0;
             dx[id].offset = offset;
             offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(ioffset);
         }
     }
     dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
     dx[id].jp.x[i] = xx;
     dx[id].score = delx;
}
else {
25     col[yy] = dely[yy];
     ij = dx[id].ijmp;
     if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] > - MAXJMP
     && xx > dx[id].jp.x[i]+MX) || mis > dx[id].score+DINSG)) {
         dx[id].ijmp++;
         if (++ij > - MAXJMP) {
30             writeimps(id);
             ij = dx[id].ijmp - 0;
             dx[id].offset = offset;
             offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(ioffset);
         }
     }
35     dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];

```

表1(72"3)

```

dx[id].p.x(x) = xx;
dx[id].score = dely(yy);
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
5     /* last col
        */
        if (endgaps)
            col1[yy] -= ins0 + ins1 * (len1 - yy);
        if (col1[yy] > smax) {
10             smax = col1[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
15     if (endgaps && xx < len0)
        col1[yy-1] -= ins0 + ins1 * (len0 - xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
            smax = col1[yy-1];
            dmax = id;
20     }
    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
25 (void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

表1 (ツツミ)

```

/*
 *
 * print() - only routine visible outside this module
5  *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
10 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, (num), seq, (num)): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */
15
#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
20 #define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */
25
print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

30    if ((fx = fopen(outfile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, outfile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
35    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;

```

表1(つがき)

```

ix = len0;
ly = len1;
firstgap = lastgap = 0;
if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
5     pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
      ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
10     pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
      lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
      lastgap = len0 - dmax0 - 1;
      lx -= lastgap;
15     }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
      lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
      ly -= lastgap;
    }
20     getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
      pr_align(l);
    }
25

```

表1(つづき)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
5 static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;     /* leading trailing overlap */
{
10     int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double   pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;
15
    /* get total matches, score
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
20     p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
25     while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
30         }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
35         }
        else {

```

表1(つぎ)

```

    if (xbm["p0-A"]&xbm["p1-A"])
        nm++;
    if (n0++ == pp[0].x[0])
        siz0 = pp[0].n[0]++;
5      if (n1++ == pp[1].x[1])
        siz1 = pp[1].n[1]++;
        p0++;
        p1++;
    }
10  }

/* pct homology:
   * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
   * else, knock off overhangs and take shorter core
15  */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
20  pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(x, "\n");
    fprintf(x, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
25

```

表1(つぎ)

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
5   (void) sprintf(outx, "%d %s%s",
      gapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
      fprintf(fx, "%s", outx);

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
10  if (gapy) {
      (void) sprintf(outx, "%d %s%s",
      gapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
      fprintf(fx, "%s", outx);
    }
15  if (dna)
      fprintf(fx,
      "\n< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
      smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINS1);
    else
20  fprintf(fx,
      "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
      smax, PINSO, PINS1);
    if (endgaps)
25  fprintf(fx,
      "\n< endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
      firstgap, (dna)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
      lastgap, (dna)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
30  fprintf(fx, "\n< endgaps not penalized\n");

static nm;          /* matches in core -- for checking */
static lmax;        /* lengths of stripped file names */
static ij[2];       /* jmp index for a path */
35 static nc[2];     /* number at start of current line */
static ni[2];       /* current elem number -- for gapping */

```

表1(つぎ)

```

static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
5 static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
10 static
pr_align()                                pr_align
{
    int      nn;      /* char count */
    int      more;
15 register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = strlen(pp[i]);
        if (nn > lmax)
20         lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = pp[i] - 0;
25        ps[i] = seqx(i);
        po[i] = out[i];
    }

```

表1 (フグキ)

```

for (nn = rn = 0, more = 1; more;) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
5         /*
           * do we have more of this sequence?
           */
           if (!*ps[i])
               continue;
10
           more++;

           if (pp[i].spc) { /* leading space */
               *po[i]++ = ' ';
15               pp[i].spc--;
           }
           else if (siz[i]) { /* in a gap */
               *po[i]++ = '-';
               siz[i]--;
20           }
           else { /* we're putting a seq element
                  */
               *po[i] = *ps[i];
               if (islower(*ps[i]))
25                   *ps[i] = toupper(*ps[i]);
               po[i]++;
               ps[i]++;

               /*
30               * are we at next gap for this seq?
               */
               if (ni[i] == pp[i].x[i][i]) {
                   /*
35                   * we need to merge all gaps
                   * at this location
                   */

```

--pr_align

表1 (つぎ)

```

...dumpblock
(void) puts("\n", fx);
5   for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i] != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
10          stars();
            putline(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                fprintf(fx, star);
            if (i == 1)
15          nums(i);
        }
    }
}

20 /*
   * put out a number line: dumpblock)
   */
   static
   nums(ix)
25     int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
   {
       char    nline[P_LINE];
       register    l;
       register char    *pn, *px, *py;
30
       for (pn = nline, i = 0; i < lmax + P_SPC; i++, pn++)
           *pn = ' ';
       for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
           if (*py == ' ' || *py == '-')
35             *pn = ' ';
           else {

```

nums

表1(フグミ)

```

    if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[i] != 1)) {
        j = 6 < 0 ? i : i;
        for (px = pn; j != 10, px--)
            *px = j%10 + '0';
5         if (i < 0)
            *px = '-';
        }
        else
            *pn = '-';
10         i++;
    }
}
*pn = '0';
nc[i] = i;
15 for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) puts("pn, ix);
    (void) puts("\n", ix);
}
20 /*
    * put out a line (name, (num), seq, (num): dumpblock()
    */
static
putline(ix)
25     int ix;
    {
        putline

```

表1 (フガマ)

```

5      int          i;
      register char *px;

      for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '\0'; px++, i++)
          (void) putc(*px, fx);
10     for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void) putc(' ', fx);

      /* these count from 1:
      * n[] is current element (from 1)
      * nc[] is number at start of current line
15     */
      for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void) putc(*px&0x7F, fx);
      (void) putc('\n', fx);
20 }

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]); dumpblock()
 */
25 static
stars()
{
30     int          i;
      register char *p0, *p1, cx, *px;

      if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0] == ' ')) ||
          !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1] == ' ')))
          return;
      px = stars;
35     for (i = lmax+P_SPC; i--;)
          *px++ = '*';

```

...putline

stars

表1 (つづき)

```

for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
    if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
5         if (strcmp(*p0-'A' && *p1-'A') {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if ((dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
10                cx = ':';
            else
                cx = '.';
        }
        else
15            cx = '-';
            *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
20 }

```

表1(つづき)

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
5  static
   stripname(pn)                                stripname
   char *pn; /* file name (may be path) */
   {
   10  register char *px, *py;

   py = 0;
   for (px = pn; *px; px++)
       if (*px == '/')
           py = px + 1;
   15  if (py)
       (void) strcpy(pn, py);
       return(strlen(pn));
   }
20

25

30

35

```

表1 (つぎ)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
5  * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: rww()
 */
#include "nw.h"
10 #include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jmps */
FILE *fj;

15 int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
20 */
cleanup()
{
    int i;
    {
        if (fj)
25 (void) unlink(jname);
        exit(i);
    }
}

/*
30 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
35 getseq(file, len)
char *file; /* file name */

```

表1(7マ電)

```

int    *len; /* seq len */
{
    char    line[1024], *pseq;
    register char    *px, *py;
5      int    natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
10      exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ':' || *line == '<' || *line == '>')
15      continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
20  if ((pseq = malloc((unsigned)tlen+6)) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
25

```

表1(つぎ)

```

5      py = pseq + 4;
      *lan = *lan;
      rewind(fp);

      while (fgets(line, 1024, fp) {
          if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
              continue;
10         for (px = line; *px != '\n'; px++) {
              if (isupper(*px))
                  *py++ = *px;
              else if (islower(*px))
                  *py++ = toupper(*px);
15         if (index("ATGCU", *(py-1))
            natgc++;
        }
    }
    *py++ = '\0';
20    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (klen/3);
    return(pseq+4);
}

25 char *
g_calloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;        /* number and size of elements */
30 {
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc(unsigned)nx, (unsigned)sz) == 0) {
35         if (!msg) {
             fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
             exit(1);
         }
    }
}

```

..getseq

g_calloc

表1 (フグモ)

```

    }
    }
    return(px);
}
5
/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
10 {
    int      fd = -1;
    int      siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

15     if (!f) {
        (void) fclose(f);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
20         }
    }
    for (j = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
25             for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

表1(つぎ)

```

...readjumps
    if (i < 0 && dx[dmax].offset && !j) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
5       (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
10      break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
15  }
if (i >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
20  if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i] = -siz;
        xj += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
25  pp[1].x[i] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps) ? -siz : MAXGAP;
30  i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
35  gapx++;
        ngapx += siz;

```

表1(フブキ)

```

/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps) ? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
5      }
      else
        break;
    }

10  /* reverse the order of jmps
    */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
15  }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
20  if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
    if (fp) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
25  offset = 0;
    }
}
}

```

表イ(つがき)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any: nwl)
5  */
writeimps(ix)                                writeimps
{
    int    ix;

    char    *mktemp();

10     if (!fp) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup1;
15         }
        if (! (f = fopen(jname, "w")) || ! f) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
20     }
    (void) fwrite(char *)&dx[ix].p, sizeof(struct jmp, 1, f);
    (void) fwrite(char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset, 1, f);
}

25

30

35

```

【 0 0 8 2 】

【表2】

PRO	XXXXXXXXXXXXXX	(長さ=15アミノ酸)
Comparison Protein	XXXXXXXXXXXX	(長さ=12アミノ酸)

%アミノ酸配列同一性=

(ALIGN-2により決定されるように、2つのポリペプチド間の同一に適合するアミノ酸の数) /
(PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

$5/15 = 33.3\%$

【0083】

【表3】

PRO	XXXXXXXXXX	(長さ=10アミノ酸)
Comparison Protein	XXXXXXXXXXYYZ	(長さ=15アミノ酸)

%アミノ酸配列同一性=

(ALIGN-2により決定されるように、2つのポリペプチド間の同一に適合するアミノ酸の数) /
(PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の総数) =

$5/10 = 50\%$

【0084】

【表4】

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ=14ヌクレオチド)
Comparison DNA	NNNNNNLLLLLLLL	(長さ=16ヌクレオチド)

%核酸配列同一性=

(ALIGN-2により決定されるように、2つの核酸配列間の同一に適合するヌクレオチドの数) /
(PRO-DNA 核酸配列のヌクレオチドの総数) =

$6/14 = 42.9\%$

【0085】

【表5】

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ=12ヌクレオチド)
Comparison DNA	NNNNLLLVV	(長さ=9ヌクレオチド)

%核酸配列同一性=

(ALIGN-2により決定されるように、2つの核酸配列間の同一に適合するヌクレオチドの数) /

(PRO-DNA 核酸配列のヌクレオチドの総数) =

$$4 / 12 = 33.3\%$$

(II. 本発明の組成物および方法)

(A. 全長CHEPOポリペプチド)

本発明は、本出願でCHEPOと称するポリペプチドをコードする新たに同定されそして単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に、CHEPOポリペプチドをコードするDNAは、以下の実施例でさらに詳細に開示されているように、同定しそして単離した。

【0086】

(B. CHEPO改変体)

本明細書に記載されている全長のネイティブな配列のCHEPOポリペプチドに加えて、CHEPO改変体を調製し得ることが意図されている。CHEPO改変体は、CHEPO DNA中に適切なヌクレオチド変化を導入し、そして/または所望のCHEPOポリペプチドを合成して調製し得る。当業者は、アミノ酸変化によってCHEPOの翻訳後プロセスが変わり得る、例えば、グリコシル化部位の数もしくは位置を変えるかまたは膜アンカー形成特徴を変えられ得ることを理解する。

【0087】

ネイティブな全長配列のCHEPOまたは本明細書に記載されているCHEPOの種々のドメインにおける改変は、例えば、米国特許第5,364,934号中に記載されている、例えば保存的および非保存的突然変異に関する任意の技術や指針を使用して行われ得る。改変は、ネイティブな配列のCHEPOと比較し

たとき、CHEPOのアミノ酸配列が変化しているCHEPOをコードする1つ以上のコドンの置換、欠失または挿入であり得る。必要に応じて、上記バリエーションは、CHEPOの1つ以上のドメイン中の少なくとも1個のアミノ酸を他の任意のアミノ酸で置換することによるものである。所望の活性に悪い影響を与えることなくどのアミノ酸残基を挿入し、置換し、または欠失させ得るのかを決定する際の手引きは、CHEPOの配列を公知の相同性タンパク質分子の配列と比較しそして高い相同性領域中でなされるアミノ酸配列変化の数を最小限にすることによって見いだされ得る。アミノ酸置換は、1つのアミノ酸を同様な構造および/または化学的特性を有する別のアミノ酸で置換すること、例えばセリンによるロイシンの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であり得る。挿入または欠失は、必要に応じて、約1~5個のアミノ酸の範囲内であり得る。可能な改変は、配列内のアミノ酸の挿入、欠失または置換を系統的に行い、そして得られた改変体を全長または成熟ネイティブな配列のが示す活性について試験することによって決定し得る。

【0088】

CHEPOポリペプチドのフラグメントを本明細書中で提供する。このようなフラグメントはN末端またはC末端で短縮され得るかまたは、例えば、全長の天然タンパク質と比較したとき、内部残基を欠失し得る。特定のフラグメントは、CHEPOポリペプチドの所望の生物学的活性に必須でないアミノ酸残基を欠失している。

【0089】

CHEPOフラグメントは多数の従来技術のうちのいずれかで調製され得る。所望のペプチドフラグメントは化学的に合成され得る。代替的なアプローチは酵素的消化によって、例えば特定のアミノ酸残基によって特定される部位のタンパク質を切断することが公知の酵素でタンパク質を処理するかまたは適切な制限酵素でDNAを消化し、そして所望のフラグメントを単離することによってCHEPOフラグメントを産生することを含む。なおもう1つの適切な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、所望のポリペプチドフラグメントをコードするDNAフラグメントを単離しそして増幅することを包含する。PCRにおい

では、DNAフラグメントの所望の末端を規定するオリゴヌクレオチドが5'および3'プライマーに使用される。好ましくは、CHEPOポリペプチドフラグメントは、図3に示されている天然CHEPOポリペプチド(配列番号2および5)と少なくとも1つの生物学のおよび/または免疫学的活性を共有している。

【0090】

特定の実施形態においては、目的の保存的置換を好ましい置換という標題で表6中に示す。このような置換によって生物学活性が変化する場合には、表6中で例示的な置換と命名されているかまたはアミノ酸クラスに関して以下でさらに記載されている、より一層実質的な変化を導入しそして産物をスクリーニングする。

【0091】

【表6】

表 6

もとの 残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu
Leu (L)	; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala;	leu

CHEPOポリペプチドの機能または免疫学的同一性の実質的な改変は、(a)置換領域におけるポリペプチド骨格の構造、例えば、シートまたはヘリックスコンホメーション、(b)標的部位の分子の電荷または疎水性、または(c)側鎖のかさ高さ(bulk)の維持に対する影響が顕著に異なっている置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は共通の側鎖特性に基づいて次のようにグループ分けされる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

- (2) 中性の親水性: cys、ser、thr;
- (3) 酸性: asp、glu;
- (4) 塩基性: asn、gln、his、lys、arg;
- (5) 鎖配向に影響を与える残基: gly、pro; ならびに
- (6) 芳香族: trp、tyr、phe。

【0092】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを必要とする。このような置換残基を保存的置換部位内に、または、より好ましくは、残りの(非保存)部位内に導入し得る。

【0093】

このバリエーションは、オリゴヌクレオチド媒介性(部位特異的)変異誘発、アラニンスキャニングおよびPCR変異誘発のような当該分野で公知の方法を使用して行い得る。クローン化したDNAに対して、部位特異的変異誘発[Carterら、Nucl. Acids Res. 13:4331(1986); Zollerら、Nucl. Acids Res., 10:6487(1987)]、カセット変異誘発[Wellsら、Gene, 34:315(1985)]、制限選択変異誘発[Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317:415(1986)]または他の公知の技術を実行して、CHEPO改変体DNAを産生し得る。

【0094】

スキャニングアミノ酸分析を使用して、連続的な配列に沿って1個以上のアミノ酸を同定し得る。好ましいスキャニングアミノ酸のなかには比較的小さな中性アミノ酸がある。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリンおよびシステインが挙げられる。アラニンは - 炭素を越えた側鎖が無くそして改変体の主鎖コンホメーションを変えることはあまりない[CunninghamおよびWells、Science, 244:1081~1085(1989)]ので、このグループのなかでアラニンは代表的には好ましいスキャニングアミノ酸である。アラニンはまた、これが最も一般的なアミノ酸であるという理由で、代表的には好ましい。さらに、アラニンは隠れた位置と露出した位置の両方に

しばしば見られる [Creighton、The Proteins (W. H. Freeman & Co.、NY) ; Chothia、J. Mol. Biol.、150 : 1 (1976)]。アラニン置換によって適切な量の改変体が得られない場合、アイソテリック (isoteric) アミノ酸を使用し得る。

【0095】

(C. CHEPOの改変)

CHEPOの共有結合改変は本発明の範囲内に含まれる。共有結合改変の1つのタイプとしては、CHEPOポリペプチドの標的化されたアミノ酸残基を、CHEPOの選択された側鎖またはN末端残基もしくはC末端残基と反応し得る有機誘導体化剤 (organic derivatizing agent) と反応させることが挙げられる。二官能性薬剤による誘導体化は、例えば、抗CHEPO抗体の精製方法で使用するためにCHEPOを水不溶性の支持体マトリックスまたは表面と架橋させるために有用であり、そして逆の場合も同じである。通常使用される架橋剤には、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(例えば4-アジドサリチル酸とのエステル)、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)のようなジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタンのような二官能性マレイミド、およびメチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートのような薬剤が挙げられる。

【0096】

他の改変としては、グルタミニルおよびアスパラギニル残基の、それぞれ対応するグルタミルおよびアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の-アミノ基のメチル化 [T. E. Creighton、Proteins: Structure and Molecular Properties、W. H. Freeman & Co.、San Francisco、79~86頁(1983)]、N末端アミンのアセチル化ならびに任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0097】

本発明の範囲内に含まれるCHEPOポリペプチドの別のタイプの共有結合改変としては、ポリペプチドのネイティブなグリコシル化パターンの改変が挙げられる。「ネイティブなグリコシル化パターンの改変」は、本発明の目的では、ネイティブな配列のCHEPO中に見られる1つ以上の炭水化物部分の欠失（元となるグリコシル化部位を取り除くか、あるいは化学的および/または酵素的手段によってグリコシル化を欠失させるかのどちらかによって）および/またはネイティブな配列のCHEPO内には存在していない1つ以上のグリコシル化部位の付加を意味することが意図される。加えて、上記の句には、ネイティブなタンパク質のグリコシル化における定性的変化が含まれており、そしてこれは存在する種々の炭水化物部分の性質および割合の変化に係わっている。

【0098】

CHEPOポリペプチドに対するグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変することにより達成され得る。この改変は、例えば、ネイティブな配列のCHEPOに（O結合型グリコシル化部位のための）1個以上のセリンまたはトレオニン残基を付加すること、またはこれら残基により置換することにより行われ得る。CHEPOアミノ酸配列はDNAレベルでの変化によって、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが産生されるように、CHEPOポリペプチドをコードするDNAを予め選択した塩基で変異させることによって、必要に応じて改変され得る。

【0099】

CHEPOポリペプチドの炭水化物部分の数を増加させるもう1つの手段はグリコシドと上記ポリペプチドの化学的または酵素的カップリングによるものである。このような方法は当該分野で、例えば、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330ならびにApplinおよびWriston、CRC Crit. Rev. Biochem., 259~306頁(1981)中に記載される。

【0100】

CHEPOポリペプチドに存在する炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵

素的に達成するか、またはグリコシル化用標的として利用されるアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によって達成することができる。化学的脱グリコシル化技術は当該分野で公知であり、そして例えば、Hakimuddinら、Arch. Biochem. Biophys.、259:52(1987)およびEdgeら、Anal. Biochem.、118:131(1981)によって記載されている。ポリペプチドの炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら、Meth. Enzymol.、138:350(1987)によって記載されるように種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを使用して達成することができる。

【0101】

CHEPOの共有結合改変のもう1つの型には、CHEPOポリペプチドを種々の非タンパク質ポリマー(例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレン)のうちの1つと、米国特許第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号または第4,179,337号中に記載されているようにして結合させることが含まれる。

【0102】

本発明のCHEPOはまた、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列と融合したCHEPOを含んでいるキメラ分子を形成するような方法で改変され得る。

【0103】

1つの実施形態では、このようなキメラ分子はCHEPOと、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合体を含んでいる。上記エピトープタグは一般的にCHEPOのアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。CHEPOのこのようなエピトープタグ化形態の存在は、このタグポリペプチドに対する抗体を使用して検出され得る。また、エピトープタグを備えることによって、このエピトープタグと結合する抗タグ抗体または別のタイプの親和性マトリックスを使用するアフィニティー精製でCHEPOを容易に精製することができる。種々のタグポリペプチドおよびそれらのそれぞれの抗体は当該分野で周知である。これらの例にはポリ-ヒスチジン(poly-hi

s) またはポリ - ヒスチジン - グリシン (poly - his - gly) タグ; flu HA タグポリペプチドおよびその抗体 12CA5 [Fieldら、Mol . Cell . Biol .、8:2159~2165(1988)]; c - myc タグおよびこれに対する 8F9、3C7、6E10、G4、B7 および 9E10 抗体 [Evanら、Molecular and Cellular Biology、5:3610~3616(1985)]; ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 D (gD) タグおよびその抗体 [Paborskyら、Protein Engineering、3(6):547~553(1990)] が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、Flag - ペプチド [Hoppら、Bio Technology、6:1204~1210(1988)]; K T3 エピトープペプチド [Martinら、Science、255:192~194(1992)]; - チューブリンエピトープペプチド [Skinnerら、J . Biol . Chem .、266:15163~15166(1991)]; および T7 遺伝子 10 タンパク質ペプチドタグ [Lutz - Freyermuthら、Proc . Natl . Acad . Sci . USA、87:6393~6397(1990)] が挙げられる。

【0104】

代替的な実施形態では、上記キメラ分子は CHEPO と免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定領域との融合体を含み得る。上記キメラ分子の二価形態 (免疫アドヘシンとも称される) では、このような融合体は IgG 分子の Fc 領域に対するものであり得る。上記 Ig 融合体は好ましくは、Ig 分子内の少なくとも 1 つの可変領域の代わりに CHEPO ポリペプチドの可溶性 (膜貫通ドメイン欠失または不活化) 形態による置換を含んでいる。特に好ましい実施形態では、免疫グロブリン融合体は IgG 1 分子のヒンジ、CH2 および CH3 またはヒンジ、CH1、CH2 および CH3 領域を含んでいる。免疫グロブリン融合体の調製に関しては、1995年6月27日に発行された米国特許第 5,428,130 号も参照のこと。

【0105】

(D . CHEPO の調製)

以下の説明は主として、CHEPO核酸を含むベクターで形質転換されるかまたはトランスフェクションされた細胞の培養によるCHEPOの生成に関する。もちろん、CHEPOを調製するために当該分野で周知である代替的な方法を使用し得ることが意図されている。例えば、CHEPO配列またはその部分は、固相技術を使用して直接的なペプチド合成で生成され得る [例えば、Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis、W.H. Freeman Co.、San Francisco, CA (1969); Merrifield、J. Am. Chem. Soc.、85:2149~2154 (1963) 参照]。インビトロタンパク質合成は、手動技術を使用するかまたは自動により実施され得る。自動化合成は、例えば、Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) を使用し、製造者の説明書を用いて達成され得る。CHEPOの種々の部分を化学的に別々に合成し得、そして化学的または酵素的方法を使用して組み合わせて、全長CHEPOを生成し得る。

【0106】

(1. CHEPOをコードするDNAの単離)

CHEPOをコードするDNAは、CHEPO mRNAを有し、かつそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製したcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒトCHEPO DNAは好都合なことに、実施例に記載されるように、ヒト組織から調製したcDNAライブラリーから得ることができる。CHEPOをコードする遺伝子はまた、ゲノムライブラリーから得られ得るか、または公知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)によって得られ得る。

【0107】

ライブラリーは、問題の遺伝子またはこの遺伝子によってコードされているタンパク質を同定するように設計されたプローブ(例えば、CHEPOに対する抗体または少なくとも約20~80塩基のオリゴヌクレオチド)を使用してスクリーニングすることができる。選択したプローブによるcDNAまたはゲノムライブラリーのスクリーニングは、標準的な方法、例えば、Sambrookら、M

olecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中に記載されている方法を使用して実施され得る。CHEPOをコードする遺伝子を単離する代替的な手段は、PCR法 [Sambrookら (上述) ; Dieffenbachら、PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)] を使用することである。

【0108】

以下の実施例はcDNAライブラリーをスクリーニングする技術を記載している。プローブとして選択されるオリゴヌクレオチド配列は、擬似陽性を最小限にするに十分な長さで且つ十分に明白でなければならない。オリゴヌクレオチドは、好ましくは、このオリゴヌクレオチドがスクリーニングされているライブラリー中のDNAび対するハイブリダイゼーションによって検出され得るように標識される。標識化方法は当該分野で周知であり、そして³²P-標識ATPのような放射性標識の使用、ビオチン付加または酵素標識化が挙げられる。中程度のストリンジェンシーおよび高いストリンジェンシーを含むハイブリダイゼーション条件は、上述のSambrookら中に提供されている。

【0109】

このようなライブラリースクリーニング方法で同定された配列は、GenBankのような公的なデータベースまたは他の私的な配列データベースに寄託されそしてそこで利用可能な他の公知の配列と比較し、そしてアラインさせ得る。この分子の規定の領域内または全長配列にわたる配列同一性(アミノ酸またはヌクレオチドレベルのどちらか)は当該分野で公知であり、かつ本明細書に記載の方法を使用して決定され得る。

【0110】

タンパク質コード配列を有する核酸は、本明細書で初めて開示された推定アミノ酸配列を使用し、そして必要な場合、前駆体を検出するために、上述のSambrookら中に記載される従来のプライマー伸長法を使用して、選択したcD

NAまたはゲノムライブラリーをスクリーニングし、そしてcDNAに逆転写されていないと思われるmRNAの中間体をプロセッシングして得ることができる。

【0111】

(2. 宿主細胞の選択および形質転換)

宿主細胞は、CHEPO製造のために本明細書に記載した発現またはクローニングベクターでトランスフェクションするかまたは形質転換され、そしてプロモーターを誘発するか、形質転換体を選択するか、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適するように修飾した従来の栄養培地中で培養する。培地、温度、pH等のような培養条件は、過度の実験を行うことなく当業者により選択され得る。一般的に、細胞培養物の生産性を最大化するための原則、プロトコールおよび実践技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach、M. Butler編 (IRL Press、1991) および上述のSambrookら中に見ることができる。

【0112】

真核生物細胞のトランスフェクション方法および原核生物細胞の形質転換方法は当業者に公知である(例えば、 CaCl_2 、 CaPO_4 、リポソーム媒介性およびエレクトロポレーション)。使用する宿主細胞に依存して、形質転換はこのような細胞に適する標準的な技術を使用して行われる。上述のSambrookら中に記載されているような塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、またはエレクトロポレーションは一般的に原核生物に対して使用される。Agrobacterium tumefaciensによる感染は、Shawら、Gene、23:315(1983)および1989年6月29日に公開されたWO89/05859によって記載されているように、特定の植物細胞を形質転換するために使用される。このような細胞壁がない哺乳動物細胞では、Grahamおよびvan der Eb、Virology、52:456~457(1978)のリン酸カルシウム沈降法を使用し得る。哺乳動物細胞宿主系トランスフェクションの一般的な局面は、米国特許第4,399,216号中に記載されている。酵母内への形質転換は、代表的にはVan Solingenら、J. Bact

..、130:946(1977)およびHsiaoら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)、76:3829(1979)の方法に従って実施される。しかし、DNAを細胞内に導入する他の方法(例えば核微量注入、エレクトロポレーション、インタクトな細胞との細菌プロトプラスト融合または多価陽イオン、例えば、ポリブレン、ポリオルニチンによる方法)を使用し得る。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら、Methods in Enzymology、185:527~537(1990)およびMansourら、Nature、336:348~352(1988)を参照のこと。

【0113】

本明細書中に記載のベクター内のDNAをクローニングするかまたは発現させるための適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母または高等真核生物細胞が挙げられる。適切な原核生物としては、真正細菌(eubacterium)、例えばグラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、E. coliのようなEnterobacteriaceaeが挙げられるが、これらに限定されない。種々のE. coli株、例えばE. coli K12株MM294(ATCC 31,446); E. coli X1776(ATCC 31,537); E. coli株W3110(ATCC 27,325)およびK5 772(ATCC 53,635)が公的に入手可能である。他の適切な原核宿主細胞としては、Enterobacteriaceae(Escherichia(例えばE. coli)、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella、Proteus、Salmonella(例えば、Salmonella typhimurium)、Serratia(例えば、Serratia macescans)およびShigella)、ならびにBacilli(例えば、B. subtilisおよびB. licheniformis(例えば、1989年4月12日に公開されたDD 266,710に開示されているB. licheniformis 41P))、Pseudomonas(例えば、P. aeruginosa)およびStreptomycesが挙げられる。これらの例は限定ではなく、例示である。株W3110は組換えDNA産物発酵用の通

常の宿主株であるので、これは1つの特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは、この宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素しか分泌しない。例えば、株W3110は、この宿主に内在性のタンパク質をコードする遺伝子に遺伝子変異を生じさせるように改変され得、このような宿主の例としては、完全な遺伝子型 *tonA* を有している *E. coli* W3110株1A2；完全な遺伝子型 *tonA ptr3* を有している *E. coli* W3110株9E4；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT karl* を有している *E. coli* W3110株27C7 (ATCC 55,244)；完全な遺伝子型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG karl* を有している *E. coli* W3110株37D6；*E. coli* W3110株40B4（これは非カナマイシン耐性 *degP* 欠失変異を有する株37D6である）；および1990年8月7日に発行された米国特許第4,946,783号中に開示されている変異ペリプラスムプロテアーゼ (*periplasmic protease*) を有している *E. coli* 株が挙げられる。あるいは、クローニングのインビトロ方法、例えばPCRまたは他の核酸ポリメラーゼ反応が適している。

【0114】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母のような真核微生物はCHEPOコードベクター用の適切なクローニングまたは発現用宿主である。*Saccharomyces cerevisiae* は、一般的に使用される下等真核宿主微生物である。他のものとしては、*Schizosaccharomyces pobe* (BeachおよびNurse、Nature、290:140 [1981]；1985年5月2日に公開されたEP 139,383)；*Kluyveromyces* 宿主 (米国特許第4,943,529号；Fleerら、Bio/Technology、9:968~975 (1991))、例えば、*K. lactis* (MW98-8C、CBS683、CBS4574；Louvencourtら、J. Bacteriol.、737 [1983])、*K. fragilis* (ATCC 12,424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16,

045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、*K. drosophilae* (ATCC 36,906; Van den Bergら、*Bio/Technology*、8:135(1990))、*K. thermotolerans* および *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishnaら、*J. Basic Microbiol.*、28:265~278[1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Caseら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、76:5259~5263[1979]); *Schwanniomyces*、例えば、*Schwanniomyces occidentalis* (1990年10月31日に公開されたEP 394,538); ならびに糸状菌、例えば、*Neurospora*、*Penicillium*、*Tplyocladium* (1991年1月10日に公開されたWO 91/00357)、および *Aspergillus* 宿主、例えば *A. nidulans* (Ballanceら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*、112:284~289[1983]; Tilburnら、*Gene*、26:205~221[1983]; Yeltonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、81:1470~1474[1984]) および *A. niger* (Kelly および Hynes、*EMBO J.*、4:475~479[1985]) が挙げられる。メチロトロフ酵母 (*methylotrophic yeast*) は本発明に適しており、そしてこれらとしては、*Hansenula*、*Candida*、*Kloeckera*、*Pichia*、*Saccharomyces*、*Torulopsis* および *Rhodotorula* からなる属から選択されるメタノールで増殖可能な酵母が挙げられるが、これらに限定されない。このクラスの酵母の例示である特定の種の列挙は、C. Anthony、*The Biochemistry of Methylotrophs*、269(1982) 中に見ることができる。

【0115】

グリコシル化したCHEPOを発現するための適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、*Drosophila* S2および*Spodoptera* Sf9のような昆虫細胞ならびに植物細胞が挙げられる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、チャイニーズ・ハムスター卵巣(CHO)細胞およびCOS細胞が挙げられる。さらに特定の例としては、SV40で形質転換したサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚性腎臓株(293細胞または懸濁培養で増殖させるためにサブクローン化した293細胞、Grahamら、*J. Gen. Virol.*、36:59(1977))；チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO、UrlaubおよびChasin、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、77:4216(1980))；マウス・セルトリ細胞(TM4、Mather、*Biol. Reprod.*、23:243~251(1980))；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL75)；ヒト肝細胞(Hep G2、HB 8065)；およびマウス乳癌(MMT 060562、ATCC CCL51)が挙げられる。適切な宿主細胞の選択は当該分野の技術範囲内であると考えられる。

【0116】

(3. 複製可能なベクターの選択および使用)

CHEPOをコードする核酸(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)は、クローニング(DNAの増幅)または発現のために複製可能なベクター内に挿入され得る。種々のベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列を種々の手順によりベクターへ挿入し得る。一般的に、DNAは、当該分野で公知の技術を使用して適切な制限エンドヌクレアーゼ部位内に挿入される。ベクター構成成分としては、一般的に、1つ以上のシグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列が挙げられるが、これらに限定されない。1つ以上のこれら構成成分を含む適切なベクターの構築には、当業者に公知の標準的な連結技術が使用される。

【0117】

CHEPOは、直接組換え的に産生されるだけでなく、成熟型タンパク質またはポリペプチドN末端の特定の切断部位を有しているシグナル配列または他のポリペプチドであり得る異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換え的に産生され得る。一般に、上記シグナル配列はベクターの構成成分であり得るかまたはベクター内に挿入されるCHEPOコードDNAの一部であり得る。このシグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ippまたは熱安定エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であり得る。酵母から分泌させるためには、上記シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー（これには*Saccharomyces*および*Kluyveromyces* 因子リーダーが挙げられ、後者は米国特許第5,010,182号中に記載されている）もしくは酸ホスファターゼリーダー、*C. albicans* グルコアミラーゼリーダー（1990年4月4日に公開されたEP 362,179）または1990年11月15日に公開されたWO 90/13646中に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞発現においては、哺乳動物シグナル配列、例えば、同一種または関連種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列ならびにウイルス分泌リーダーを使用して、タンパク質の分泌を方向付け得る。

【0118】

発現ベクターとクローニングベクターは共に、1つ以上の選択された宿主細胞内でそのベクターを複製させ得る核酸配列を含む。このような配列は種々の細菌、酵母およびウイルスについて周知である。プラスミドpBR322由来の複製起点は大部分のグラム陰性菌に適しており、2プラスミド起点は酵母に適しており、そして種々のウイルス起点（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV）は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

【0119】

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、選択マーカーとも称される選択遺伝子を含む。代表的な選択遺伝子は、(a)抗生物質または他のトキシン、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリンに対して耐性を付与するタンパク質か、(b)栄養要求性欠乏を補足

するタンパク質かまたは複雑な培地から入手できない重要な栄養を供給するタンパク質をコードする(例えば*Bacillus*のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子)。

【0120】

哺乳動物細胞用の適切な選択マーカーの例は、CHEPOコード核酸を取り込む能力のある細胞の同定を可能にする選択マーカー(例えば、DHFRまたはチミジンキナーゼ)である。野生型DHFRを使用する場合に適する宿主細胞は、Urlaubら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、77:4216(1980)によって記載されているようにして調製されそして増殖されたDHFR活性を欠失しているCHO細胞株である。酵母で使用される適切な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7中に存在するNature、282:39(1979);Kingsmanら、*Gene*、7:141(1979);Tschemperら、*Gene*、10:157(1980)]。trp1遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠いている酵母の変異株、例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1[Jones、*Genetics*、85:12(1977)]の選択マーカーを提供する。

【0121】

発現ベクターおよびクローニングベクターは通常、mRNA合成を指令するためにCHEPOコード核酸配列と作動可能に連結したプロモーターを含む。種々の潜在的宿主細胞によって認識されるプロモーターは周知である。原核宿主で使用するために適しているプロモーターとしては、-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系[Changら、*Nature*、275:615(1978);Goeddelら、*Nature*、281:544(1979)]、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[Goeddel、*Nucleic Acids Res.*、8:4057(1980);EP 36,776]ならびにtacプロモーターのようなハイブリッドプロモーター[deBoerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、80:21~25(1983)]が挙げられる。細菌系で使用するためのプロモーターはま

た、CHEPOをコードするDNAと作動可能に連結したシャイン・ダルガーノ(S・D・)配列を含む。

【0122】

酵母宿主で使用される適切なプロモーター配列(promoting sequence)の例としては、3-ホスホグリセレートキナーゼ[Hitzmanら、J. Biol. Chem.、255:2073(1980)]または他の解糖酵素[Hessら、J. Adv. Enzyme Req.、7:149(1968); Holland、Biochemistry、17:4900(1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼのプロモーターが挙げられる。

【0123】

増殖条件によって転写が制御されるというさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関係のある分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼならびにマルトースおよびガラクトース利用にを担う酵素のプロモーター領域である。酵母発現で使用される適切なベクターおよびプロモーターはEP 73,657中でさらに記載されている。

【0124】

哺乳動物宿主細胞内におけるベクターからCHEPOの転写は、例えば、ウイルスのゲノムから得られるプロモーター、例えばポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス(1989年7月5日に公開されたUK 2,211,504)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよびシミアン・ウイルス40(SV40)から得られるプロモーター、異種哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから得られ

るプロモーター、ならびに熱ショックプロモーターから得られるプロモーターによって制御されるが、但し、このようなプロモーターは宿主細胞株と適合性である。

【0125】

高等真核生物によるCHEPOをコードするDNAの転写は、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することによって増大され得る。エンハンサーは、プロモーターに作用してその転写を増大させる、通常、約10から300bpまでのDNAのシス作用性エレメントである。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在公知である(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スリン)。しかし、当業者は、代表的には、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。これらの例としては、複製起点の後側(bp 100~270)の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、複製起点の後側の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が挙げられる。上記エンハンサーはベクター内のCHEPOコード配列の5'または3'位にスプライシングされ得るが、好ましくは上記プロモーターの5'位に位置させる。

【0126】

真核宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物由来の有核細胞)内で使用される発現ベクターはまた、転写終結およびmRNA安定化に必要な配列を含む。このような配列は通常、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'非翻訳領域から、そしてときには3'非翻訳領域から得られる。これらの領域は、CHEPOをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドフラグメントを含む。

【0127】

組換え脊椎動物細胞培養におけるCHEPOの合成に適合させることに適しているさらに他の方法、ベクターおよび宿主細胞はGethingら、Nature、293:620~625(1981);Manteiraら、Nature、281:40~46(1979);EP 117,060;およびEP 117,058中に記載されている。

【0128】

(4. 遺伝子増幅 / 発現の検出)

遺伝子増幅および / または発現は、本明細書で提供した配列に基づいて、適切な標識プローブを使用して、試料中で直接、例えば従来のサザンブロット法、mRNAの転写を定量するノーザンブロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201~5205 (1980)]、ドットブロット法 (DNA分析) またはインサイチュハイブリダイゼーションで測定され得る。あるいは、DNA二重鎖、RNA二重鎖およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識し得る抗体を使用し得る。これらの抗体は順次標識し得、そしてアッセイを実施し得、そのアッセイにおいて、二重鎖が表面に結合され、その結果、表面に二重鎖が形成されると、この二重鎖に結合した抗体の存在を検出し得る。

【0129】

あるいは、遺伝子発現を免疫学的方法、例えば、細胞または組織切片の免疫組織化学的染色および細胞培養物または体液のアッセイによって測定して、遺伝子産物の発現を直接定量し得る。免疫組織化学的染色および / またはサンプル液体のアッセイに有用な抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかであり得、そして任意の哺乳動物において調製され得る。好都合には、これら抗体はネイティブな配列のCHEPOポリペプチドに対してか、または本明細書中で提供されるDNA配列に基づく合成ペプチドに対してか、またはCHEPO DNAと融合しそして特定の抗体エピトープをコードする外来配列に対して調製され得る。

【0130】

(5. ポリペプチドの精製)

CHEPOの形態物は、培養培地または宿主細胞溶解物から回収され得る。膜と結合している場合、これは適切な境界活性剤溶液 (例えば、Triton-X100) を使用するかまたは酵素的切断によって膜から遊離され得る。CHEPOの発現に使用された細胞は、種々の物理的または化学的手段、例えば凍結-融解反復、超音波処理、機械的破壊または細胞溶解剤によって破壊され得る。

【0131】

組換え細胞タンパク質またはポリペプチドからCHEPOを精製することは望ましい。以下の手順は適切な精製手順の例である：イオン交換カラムでの分画；エタノール沈澱；逆相HPLC；シリカまたはDEAEのような陽イオン交換樹脂によるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈降；例えば、セファデックスG-75を用いるゲルろ過；IgGのような夾雑物を除去するプロテインAセファロースカラム；およびCHEPOのエピトープ-タグ化形態と結合する金属キレート化カラム。種々のタンパク質精製方法が使用され得、そしてこのような方法は当該分野で公知であり、そして例えば、Deutscher、Methods in Enzymology、182(1990)；Scopes、Protein Purification: Principles and Practice、Springer-Verlag、New York(1982)中に記載される。選択される精製工程は、例えば、使用される製造方法および生成される特定のCHEPOの性質に依存する。

【0132】

(E-CHEPOの使用)

CHEPOをコードするヌクレオチド配列(またはそれらの相補鎖)は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学分野、染色体および遺伝子マッピングならびにアンチセンスRNAおよびDNAの産生における種々の適用を有する。CHEPO核酸はまた、本明細書中で記載した組換え技術によるCHEPOポリペプチドの調製に有用である。

【0133】

全長のネイティブな配列のCHEPO cDNA(配列番号3)またはその部分は、全長CHEPO cDNAを単離するかまたは図2に開示されているCHEPO配列(配列番号3)と所望の配列同一性を有するさらに他のcDNA(例えば、天然に存在するCHEPO改変体または他の種から得られるCHEPOをコードするもの)を単離するために、cDNAライブラリーのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。必要に応じて、これらプローブの長さは約

20～約50塩基である。上記ハイブリダイゼーションプローブは、配列番号3のヌクレオチド配列の少なくとも部分的に新規な領域から（ここで、その領域は、過度の実験を行うことなく決定され得る）か、またはネイティブな配列のCHEPOのプロモーター、エンハンサーエレメントおよびイントロンを含むゲノム配列から誘導され得る。一例として、スクリーニング方法は、公知のDNA配列を使用して約40塩基の選択されたプローブを合成してCHEPO遺伝子のコード領域を単離することを含んでいる。ハイブリダイゼーションプローブは、³²Pもしくは³⁶Sのような放射性ヌクレオチドまたは酵素標識、例えばアビジン/ビオチンカップリング系を介してプローブとカップリングしているアルカリホスファターゼを含む種々の標識により標識され得る。本発明のCHEPO遺伝子の配列と相補的な配列を有している標識プローブを使用してヒトcDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーをスクリーニングして、上記プローブがこのようなライブラリーのうちのどのメンバーとハイブリダイズするのかを決定し得る。ハイブリダイゼーション技術は以下の実施例でさらに詳細に記載される。

【0134】

本出願で開示されているEST配列はいずれも、本明細書で開示した方法を使用して、プローブとして同様に使用され得る。

【0135】

CHEPO核酸の他の有用なフラグメントとしては、標的CHEPO mRNA（センス）またはCHEPO DNA（アンチセンス）配列と結合し得る一本鎖核酸配列（RNAかまたはDNAのどちらか）を含んでいるアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。本発明によれば、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドはCHEPO DNAのコード領域のフラグメントを含む。このようなフラグメントは一般的に、少なくとも約14のヌクレオチド、好ましくは約14から30までのヌクレオチドを含んでいる。所定のタンパク質をコードするcDNA配列に基づいてアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えば、SteinおよびCohen（Cancer Res. 48:2659、1988）およびvan der Kroelら（Bio Techniques 6:958、1988）中に記載される。

【0136】

アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドが標的核酸配列と結合すると、二重鎖の分解増強、転写もしくは翻訳の成熟前終結 (premature termination) を含む幾つかの手段のうちの1つまたは他の手段によって上記標的配列の転写または翻訳をブロックする二重鎖の形成を生じる。従って、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用してCHEPOタンパク質の発現をブロックし得る。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドはさらに、改変された糖-ホスホジエステル骨格(または他の糖結合、例えばWO91/06629中に記載されているもの)を有するオリゴヌクレオチドを含み、そしてその際このような糖結合は内因性ヌクレアーゼに抵抗性である。抵抗性の糖結合を有するこのようなオリゴヌクレオチドはインビボで安定である(即ち、酵素的分解に抵抗し得る)が、標的ヌクレオチド配列と結合し得る配列特異性は保持している。

【0137】

センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例としては、有機部分(例えばWO90/10048中に記載されているもの)および標的核酸配列に対するオリゴヌクレオチドの親和性を高める他の部分(例えば、ポリ-(L-リシン))と共有結合しているオリゴヌクレオチドが挙げられる。さらになお、エリプチシンのようなインターカレート剤およびアルキル化剤または金属錯体をセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドと結合させて、標的ヌクレオチド配列に対するアンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドの結合特異性を改変し得る。

【0138】

アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄媒介性DNAトランスフェクション、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子導入方法によって、またはエプスタイン・バーウイルスのような遺伝子導入ベクターを使用することによって、標的核酸配列を含む細胞内に導入され得る。好ましい方法では、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは適切なレトロウイルスベクター内に挿入される。標的核酸配列を含んでいる細胞は、インビボかまた

はエクスピボのどちらかで組換えレトロウイルスベクターと接触される。適切なレトロウイルスベクターとしては、マウスレトロウイルスM - MuLVから誘導されるもの、すなわち、N2 (M - MuLVから誘導されたレトロウイルス) またはDCT5A、DCT5BおよびDCT5Cと称されるダブルコピーベクター (WO 90/13641参照) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0139】

センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、WO 91/04753中に記載されているように、リガンド結合分子と結合体を形成することによって標的ヌクレオチド配列を含んでいる細胞内に導入され得る。適切なリガンド結合分子としては、細胞表面レセプター、増殖因子、他のサイトカインまたは細胞表面レセプターと結合する他のリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、上記リガンド結合分子の結合体化は、このリガンド結合分子がその対応する分子またはレセプターと結合する能力、あるいはセンスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその結合体化バージョンの細胞内への侵入をブロックする能力には実質的に干渉しない。

【0140】

あるいは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 90/10448中に記載されているように、オリゴヌクレオチド - 脂質複合体を形成することによって標的核酸配列を含む細胞内に導入され得る。このセンスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、好ましくは、内因性リパーゼによって細胞内で解離される。

【0141】

密接に関連したCHEPOコード配列を同定するための配列プールを作製するために、上記プローブをPCR技術で使用し得る。

【0142】

CHEPOをコードするヌクレオチド配列を使用して、このCHEPOをコードする遺伝子をマッピングするためおよび遺伝子疾患を有する個体の遺伝子分析のためにハイブリダイゼーションプローブを構築し得る。本明細書中で提供されるヌクレオチド配列は、公知の技術 (例えば、インサイチュハイブリダイゼーシ

ョン、公知の染色体マーカーに対する連鎖分析およびライブラリーとのハイブリダイゼーションスクリーニング)を使用して染色体および染色体の特定の領域にマッピングされ得る。

【0143】

CHEPOのコード配列が、別のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合(例えば、CHEPOがレセプターである場合)は、CHEPOは、結合相互作用に關与する他のタンパク質または分子を同定するためのアッセイにおいて使用され得る。このような方法によって、レセプター/リガンド結合相互作用のインヒビターが同定され得る。このような結合相互作用に關与するタンパク質はまた、結合相互作用のペプチドまたは低分子インヒビターまたはアゴニストをスクリーニングするために使用され得る。また、レセプターCHEPOは、關連するリガンド(correlative ligand)を単離するために使用され得る。スクリーニングアッセイは、ネイティブなCHEPOまたはCHEPOのレセプターの生物学的活性を模倣するリード化合物を見出すために設計され得る。このようなスクリーニングアッセイは、化学的なライブラリーの高スループットスクリーニングに敏感に反応するアッセイを含み、これは、それらを低分子薬物候補を同定するために特に適切にする。意図される低分子としては、合成の有機化合物、または無機化合物が挙げられる。アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学的なスクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、および細胞に基づくアッセイを含む種々の形式で行われ得、これらは当該分野で十分に特徴付けられている。

【0144】

CHEPOまたはその改変された形態をコードする核酸もまた、トランスジェニック動物または「ロックアウト」動物のいずれかを作製するために使用され得、次いでこれらは、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングにおいて有用である。トランスジェニック動物(例えば、マウスまたはラット)は、トランスジーンを含む細胞を有する動物である。このトランスジーンは、胎児期に(例えば、胚段階で)動物または動物の先祖に導入された。トランスジーンは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノム中に組み込まれるDNAである。1

つの実施形態においては、CHEPOをコードするcDNAが、確立された技術に従ってCHEPOをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用され得、そしてゲノム配列が、CHEPOをコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。トランスジェニック動物(特に、マウスまたはラットのような動物)を作製するための方法は、当該分野で従来技術となっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号および同第4,870,009号に記載されている。代表的には、特定の細胞は、組織特異的エンハンサーを伴うCHEPOトランスジーンの取りこみのために標的化される。胚段階で動物の生殖系に導入されたCHEPOをコードするトランスジーンのコピーを含むトランスジェニック動物が、CHEPOをコードするDNAの増大された発現の影響を試験するために使用され得る。このような動物は、例えば、その過剰な発現に関連する病理学的状態からの防御を付与すると考えられる試薬についてのテスター動物として使用され得る。本発明のこの局面に従うと、動物が試薬で処置され、そしてトランスジーンを保有していない未処置の動物と比較した病理学的状態の減少した指標は、病理学的状態についての可能性のある治療介入を示す。

【0145】

あるいは、CHEPOの非ヒトホモログが、CHEPO「ノックアウト」動物を構築するために使用され得る。この動物は、CHEPOをコードする内因性の遺伝子と、動物の胚性幹細胞中に導入されたCHEPOをコードする改変されたゲノムDNAとの間での相同組換えの結果として、CHEPOをコードする遺伝子を欠損しているか、またはCHEPOをコードする遺伝子が改変されている。例えば、CHEPOをコードするcDNAは、確立された技術に従って、CHEPOをコードするゲノムDNAをクローン化するために使用され得る。CHEPOをコードするゲノムDNAの部分が欠失され得るか、またはそれが、組込みをモニターするために使用され得る選択可能なマーカーをコードする遺伝子のような別の遺伝子で置き換えられ得る。代表的には、数キロベースの改変されていない隣接しているDNA(5'および3'末端の両方)が、ベクター中に含まれる(例えば、相同組換えベクターの記載については、ThomasおよびCape

cchi, Cell, 51:503 (1987)を参照のこと)。ベクターが、胚性幹細胞株中に導入され(例えば、エレクトロポレーションによって)、そして導入されたDNAが内因性のDNAと相同組換えされた細胞が、選択される(例えば、Liら、Cell, 69:915 (1992)を参照のこと)。選択された細胞は、次いで、凝集キメラを形成するように動物(例えば、マウスまたはラット)の胎盤胞に注入される(例えば、Bradley、Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編(IRL, Oxford, 1987)、113-152頁を参照のこと)。キメラの胚は、次いで、適切な偽妊娠させた雌性の里親動物に移植され、そして胚は、「ノックアウト」動物を作製する期間を過ごす。相同組換えされたDNAをそれらの生殖細胞中に保有している子孫は、標準的な技術によって同定され得、そしてその動物の全ての細胞が相同組換えされたDNAを含む動物を交配するために使用され得る。ノックアウト動物は、例えば、特定の病理学的状態に対して防御するそれらの能力について、およびCHEPOポリペプチドの非存在に起因する病理学的状態のそれらの発症について特徴付けられ得る。

【0146】

CHEPOポリペプチドをコードする核酸はまた、遺伝子治療において使用され得る。遺伝子治療適用においては、遺伝子は、治療的に有効な遺伝子産物のインビボでの合成を達成するために、例えば、欠損遺伝子の置換のために、細胞中に導入される。「遺伝子治療」は、従来の遺伝子治療(ここでは、永続的な効果が単一の処置によって達成される)および遺伝子治療剤の投与(これは、治療的に有効なDNAまたはmRNAの1回または反復投与を含む)の両方を含む。アンチセンスRNAおよびDNAは、インビボで特定の遺伝子の発現をブロックするための治療剤として使用され得る。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらの低い細胞内濃度が細胞膜によるそれらの制限された取りこみによって生じるにもかかわらず、インヒビターとして作用し得る細胞中に輸送され得る。(Zamecnikら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143-4146 (1986))。オリゴヌクレオチドは、例えば、それらの

負に荷電したホスホジエステル基を荷電していない基で置換することによって、それらの取りこみを増強するように改変され得る。

【0147】

生存可能な細胞中に核酸を導入するために利用可能な種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が、意図される宿主の細胞のインビトロでまたはインビボで培養された細胞中に導入されるかどうかによって依存して、変化する。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸の導入に適切な技術としては、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿方法などの使用が挙げられる。現在好ましいインビボでの遺伝子導入技術としては、ウイルス（代表的には、レトロウイルス）ベクターでのトランスフェクションおよびウイルスコートタンパク質-リポソーム媒介性トランスフェクションが挙げられる(Dzauら、Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993))。いくつかの状況においては、核酸の供給源に標的細胞を標的化する薬剤（例えば、細胞表面の膜タンパク質または標的細胞に対して特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンドなど）を提供することが所望される。リポソームが使用される場合は、エンドサイトーシスに関連する細胞表面の膜タンパク質に結合するタンパク質が、例えば、特定の細胞型について向性である、キャプシドタンパク質またはそのフラグメント、循環している際にインターナライズを受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的化しそして細胞内半減期を増大するタンパク質中の取りこみを標的化および/または促進するために、使用され得る。レセプターによって媒介されるエンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら、J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987)；およびWagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)によって記載されている。遺伝子作製および遺伝子治療プロトコルの概要については、Andersonら、Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

【0148】

本明細書中に記載されているCHEPOポリペプチドはまた、タンパク質の電

気泳動の目的のための分子量マーカーとしても使用され得る。

【0149】

本明細書中に記載されているCHEPOポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸分子は、染色体の同定に有用である。これに関しては、新規の染色体マーカーを同定する必要性が現在存在している。なぜなら、実際の配列データに基づく比較的小数の染色体マーキング試薬だけが現在利用可能であるからである。本発明のそれぞれのCHEPO核酸分子が、染色体マーカーとして使用され得る。

【0150】

本発明のCHEPOポリペプチドおよび核酸分子はまた、組織のタイピングに使用され得る。ここでは、本発明のCHEPOポリペプチドは、別のものと比較した場合には、1つの組織中で差次的に発現され得る。CHEPO核酸分子は、PCR、ノーザン分析、サザン分析、およびウェスタン分析のためのプローブを作製するための使用を見出される。

【0151】

本明細書中に記載されるCHEPOポリペプチドはまた、治療剤としても使用され得る。本発明のCHEPOポリペプチドは、薬学的に有用な組成物を調製するために公知の方法に従って処方され得る。それにより、そのCHEPO生成物は、薬学的に受容可能なキャリアビヒクルとの混合物中で混合される。治療処方物は、所望の程度の純度を有している有効成分を、最適な生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤 (Remington's Pharmaceutical Science、第16版、Osol, A. 編(1980)) と混合することによって、凍結乾燥した形態または水性の溶液の形態で、保存のために調製される。受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤は、使用される投与量および濃度では、レシピエントに対しては非毒性であり、そしてこれらとして以下のものが挙げられる：緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、および他の有機酸の緩衝液）；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド、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）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）

；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）；モノサッカライド、ジサッカライド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトール、またはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウムおよび/または非イオン性境界活性剤（例えば、TWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）、またはPEG）。

【0152】

インピボでの投与に使用される処方物は、滅菌でなければならない。これは、凍結乾燥および再構成の前または後の、滅菌の濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。

【0153】

本明細書中の治療組成物は、一般には、滅菌の通路口を有している容器（例えば、静脈内溶液バッグ、または皮下注射用の注射針によって穴を空けられ得るストッパーを有しているバイアル）中に配置される。

【0154】

投与の経路は、例えば、静脈内、腹膜内、大脳内、筋肉内、眼球内、動脈内、または病変内経路による注射または注入、局所的投与、あるいは徐放システムによるような、公知の方法に従う。

【0155】

本発明の薬学的組成物の投与量および所望される薬物濃度は、想定される特定の使用されるに依存して変化し得る。投与の適切な投与量または経路の決定は、十分に当業者の技術範囲内である。動物実験は、ヒトの治療に有効な用量の決定のための信頼できる指針を提供する。有効用量の種間のスケールリングが、Mordenti, J. および Chappell, W., 「The use of interspecies scaling in toxicokinetics」 Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら編、Pergamon Press, New York 1989、42 - 96頁によって主張された原理に従って行われ得る。

【0156】

CHEPOポリペプチドまたはそのアゴニストもしくはアンタゴニストのインビボでの投与が使用される場合は、通常の投与量は、投与の経路に依存して、1日当たり約10ng/kgから100mg/kgの哺乳動物の体重まで、またはそれ以上で、好ましくは、約1g/kg/日から10mg/kg/日で変化し得る。送達の特定の投与量および方法についての指針は、以下の文献に提供される。例えば、米国特許第4,657,760号；同第5,206,344号；または同第5,225,212号を参照のこと。種々の処方物が、種々の処置化合物および種々の障害について有効であると予想される。例えば、1つの器官または組織を標的化する投与は、別の器官または組織を標的化する様式とは異なる様式での送達を必然的に伴い得る。

【0157】

CHEPOポリペプチドの徐放投与がCHEPOポリペプチドの投与を必要としている任意の疾患または障害の処置に適切である放出特性を有する処方物において処方されることが所望される場合は、CHEPOポリペプチドのマイクロカプセル化が意図される。徐放のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒトの成長ホルモン(rhGH)、インターフェロン(rhIFN)、インターロイキン-2、およびMNRgp120を用いて良好に行われている。Johnsonら、Nat. Med., 2:795-799(1996)；Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223(1993)；Horrarら、Bio/Technology, 8:755-758(1990)；Cleland、「Design and Production of Single Immunization Vaccine Using Poly lactide Polyglycolide Microsphere Systems」、Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman 編(Plenum Press: New York, 1995)、439-462頁；第WO97/03692号、第WO96/40072号、第WO96/07399号；および米国特許第5,654,010号。

【0158】

これらのタンパク質の徐放処方物は、その生体適合性および広範な生体分解性に起因して、ポリ乳酸 - ポリグリコール酸 (PLGA) ポリマーを使用して開発された。PLGA、乳酸、およびグリコール酸の崩壊産物は、ヒトの体から迅速にクリアランスされる。さらに、このポリマーの分解性は、その分子量および組成に依存して、数ヶ月から数年間までで調節され得る。Lewis、「Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer」、M. Chasin and R. Langer (編)、Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990)、1~41頁。

【0159】

本発明は、CHEPOポリペプチドを模倣する化合物(アゴニスト)、またはCHEPOポリペプチドの影響を妨げる化合物(アンタゴニスト)を同定するための、スクリーニング化合物によるスクリーニング方法を含む。アンタゴニスト薬物の候補についてのスクリーニングアッセイが、本明細書中で同定された遺伝子によってコードされるCHEPOポリペプチドに結合するか、またはそれと複合体を形成する化合物、あるいはそうでなければ、他の細胞性タンパク質とコードされるポリペプチドとの相互作用を妨害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイとしては、化学的なライブラリーの高スループットスクリーニングに敏感に反応するアッセイが挙げられる。これによって、それらは、低分子である薬物候補を同定するために特に適切にされる。

【0160】

アッセイは、タンパク質 - タンパク質結合アッセイ、生化学的なスクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、および細胞に基づくアッセイ(これらは、当該分野で十分に特徴付けられている)を含む種々の形式で行われ得る。アンタゴニストについての全てのアッセイは、これらが、薬物候補を本明細書中で同定された核酸分子によってコードされるCHEPOポリペプチドと、これらの2つの成分が相互作用させるために十分な条件下でそして十分な時間、接触させることを必要とする点で、共通している。

【0161】

結合アッセイにおいては、相互作用は結合であり、そして形成された複合体が反応混合物中で単離され得るかまたは検出され得る。特定の実施形態においては、本明細書中で同定された遺伝子によってコードされるCHEPOポリペプチドまたは薬物候補が、固相上（例えばマイクロタイタープレート上）に、共有結合または非共有結合によって固定される。非共有結合は一般には、CHEPOポリペプチドの溶液で固体の表面をコーティングすること、および乾燥させることによって達成される。あるいは、固定化されるCHEPOポリペプチドに対して特異的である固定化された抗体（例えば、モノクローナル抗体）が、固体の表面にそれをアンカーする（anchor）ために使用され得る。このアッセイは、固定化していない成分を添加することによって行われ得る。この成分は、固定化された成分（例えば、アンカーされた成分を含むコーティングされた表面）に対する検出可能な標識によって標識され得る。反応が完了すると、反応していない成分が、例えば、洗浄によって除去され、そして固体の表面上にアンカーされた複合体が検出される。もともと固定化されていない成分が検出可能な標識を保有している場合は、表面上に固定化された標識の検出は、複合体化が生じたことを示す。もともと固定化されていない成分が標識を保有していない場合は、複合体化は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識された抗体を使用することによって、検出され得る。

【0162】

候補の化合物が、本明細書中で同定される遺伝子によってコードされる特定のCHEPOポリペプチドと相互作用するがそれに結合しない場合は、CHEPOポリペプチドとのその相互作用は、タンパク質 - タンパク質相互作用を検出するための周知の方法によってアッセイされ得る。このようなアッセイとしては、伝統的なアプローチ（例えば、架橋、同時免疫沈降、および勾配またはクロマトグラフィーカラムを通じる同時精製）が挙げられる。さらに、タンパク質 - タンパク質相互作用は、ChevrayおよびNathans、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789 - 5793 (1991)によって開示されているような、Fieldsおよび共同研究者ら（Fieldsおよび

Song, Nature (London), 340:245-246 (1989); Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)) によって記載されている酵母に基づく遺伝子システムを使用することによってモニターされ得る。多くの転写活性化因子(例えば、酵母のGAL4)は、以下のような2つの物理的に異なるモジュラードメインから構成される。1つは、DNA結合ドメインとして作用し、他方は、転写活性化ドメインとして作用する。上記の刊行物に記載されている酵母の発現システム(一般には、「ツーハイブリッドシステム」と呼ばれる)は、その特性を利用し、そして以下のような2つのハイブリッドタンパク質を使用する。そのうちの1つには、標的タンパク質がGAL4のDNA結合ドメインに融合され、そして他方は、その中で候補の活性化タンパク質が活性化ドメインに対して融合されている。GAL4活性化プロモーターの制御下にあるGAL1/lacZレポーター遺伝子の発現は、タンパク質-タンパク質相互作用を通じるGAL-4活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーが、-ガラクトシダーゼの色素生成性基質を用いて検出される。ツーハイブリッド技術を使用して2つの特異的なタンパク質間でのタンパク質-タンパク質相互作用を同定するための完全なキット(MATCHMAKER™)が、Clontechから市販される。このシステムはまた、特異的なタンパク質の相互作用に参与しているタンパク質ドメインをマップするために、ならびにこれらの相互作用に重要なアミノ酸残基を正確に指摘するためにも拡大され得る。

【0163】

本明細書中で同定されたCHEPOポリペプチドをコードする遺伝子の、他の細胞内または細胞外成分との相互作用を妨害する化合物が、以下のように試験され得る：通常は、2つの生成物の相互作用および結合を可能にする条件下でそして可能にする時間で、遺伝子産物と細胞内または細胞外成分とを含有する反応混合物が調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は、試験化合物の非存在下および存在下で行われる。さらに、プラセボが、ポジティブコントロールとして作用するように、第3の反応混合物に添加され得る。試験化合物と、混合物中に存在する細胞内または細胞外成分との間での結合(複合

体の形成)は、本明細書中で上記のようにモニターされる。コントロール反応物中での複合体の形成(しかし、試験化合物を含有する反応混合物中には存在しない)は、試験化合物が、試験化合物とその反応パートナーとの相互作用を妨害することを示す。

【0164】

アンタゴニストについてのアッセイのために、CHEPOポリペプチドがCHEPOポリペプチドの存在下で目的の活性を阻害する(このことは、化合物がCHEPOポリペプチドのアンタゴニストであることを示す)化合物の特定の活性および能力をスクリーニングするために、化合物とともに細胞に添加され得る。あるいは、アンタゴニストは、競合阻害アッセイに適切な条件下で、膜に結合したCHEPOポリペプチドレセプターまたは組換えのレセプターと、CHEPOポリペプチドおよび可能性のあるアンタゴニストとを混合することによって、検出され得る。CHEPOポリペプチドは、例えば、放射活性によって標識され得、その結果、レセプターに結合したCHEPOポリペプチド分子の数が、可能性のあるアンタゴニストの有効性を決定するために使用され得る。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に公知の多数の方法(例えば、リガンドパンニングおよびFACSソーティング)によって同定され得る。Coliganら、*Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5(1991)。好ましくは、発現クローニングが使用される。ここでは、ポリアデニル化されたRNAが、CHEPOポリペプチドに応答する細胞から調製され、そしてこのRNAから作製されたcDNAライブラリーがプールに分けられ、そしてCOS細胞またはCHEPOポリペプチドに応答しない他の細胞をトランスフェクトするために使用される。ガラススライド上で増殖させられたトランスフェクトされた細胞は、標識されたCHEPOポリペプチドに対して暴露される。CHEPOポリペプチドは、部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位のヨウ素化または封入を含む種々の手段によって標識され得る。固定およびインキュベーション後、スライドは、オートラジオグラム分析に供される。ポジティブなプールが同定され、そしてサブプールが調製され、そして相互作用するサブプールを使用して再度トランスフェクトされ、そして再度スクリーニングされ、

最終的に推定のレセプターをコードする単一のクローンが得られる。

【0165】

レセプターの同定のための別のアプローチとして、標識されたCHEPOポリペプチドは、レセプター分子を発現する細胞膜または抽出調製物と光親和的に架橋され得る。架橋された材料は、PAGEによって解析され、そしてX線フィルムに曝される。レセプターを含む標識された複合体が切り出され得、ペプチドフラグメントに分割され得、そしてタンパク質の微小配列決定に供され得る。微小配列決定によって得られたアミノ酸配列を使用して、縮重オリゴヌクレオチドプローブのセットを設計し、cDNAライブラリーをスクリーニングして、推定のレセプターをコードする遺伝子を同定する。

【0166】

アンタゴニストについての別のアッセイにおいては、レセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物が、候補化合物の存在下で、標識されたCHEPOポリペプチドとともにインキュベートされる。次いで、化合物がこの相互作用を増強するかまたはブロックする能力が、測定され得る。

【0167】

可能性のあるアンタゴニストのより特異的な例としては、CHEPOポリペプチドとの免疫グロブリンの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、そして詳細には、抗体（限定的ではないが、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびに抗体フラグメント、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、ならびにそのような抗体またはフラグメントのキメラまたはヒト化バージョン、ならびにヒトの抗体および抗体フラグメントを含む）が挙げられる。あるいは、可能性のあるアンタゴニストは、密接に関連するタンパク質（例えば、レセプターを認識するが、影響は与えない、CHEPOポリペプチドの変異した形態）であり得、それによってCHEPOポリペプチドの作用を競合的に阻害し得る。

【0168】

別の可能性のあるCHEPOポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を使用して調製されたアンチセンスRNAまたはDNA構築物である。ここでは、例えば、アンチセンスRNAまたはDNA分子は、標的化されたmRNAに

対してハイブリダイズすること、およびタンパク質の翻訳を妨げることによって、mRNAの翻訳を直接ブロックするように作用する。アンチセンス技術は、3重ヘリックスの形成、またはアンチセンスDNAもしくはRNAを通じて遺伝子発現を制御するために使用され得る。これらの方法の両方ともが、DNAまたはRNAに対するポリペプチドの結合に基づく。例えば、本明細書中の成熟CHEPOポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード部分が、約10から40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するために使用される。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に關与している遺伝子の領域に対して相補的であるように設計され(3重ヘリックス - Leeら、*Nucleic Acids Res.*, 6:3073(1979); Cooneyら、*Science*, 241:456(1988); Dervanら、*Science*, 251:1360(1991))、それによってCHEPOポリペプチドの転写および産生を妨げる。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、mRNAに対してインピボでハイブリダイズし、そしてCHEPOポリペプチドへのmRNA分子の翻訳をブロックする(アンチセンス - Okano, *Neurochem.*, 56:560(1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)。上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に送達され得、その結果、アンチセンスRNAまたはDNAが、CHEPポリペプチドの産生を阻害するようにインピボで発現され得る。アンチセンスDNAが使用される場合は、翻訳開始部位に由来するオリゴデオキシヌクレオチド(例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の約-10位と+10位の間)が、好ましい。

【0169】

可能性のあるアンタゴニストとしては、活性化部位、レセプター結合部位、または増殖因子、あるいはCHEPOポリペプチドの他の關連する結合部位に結合し、それによってCHEPOポリペプチドの正常な生物学的活性をブロックする低分子が挙げられる。低分子の例としては、小さいペプチドまたはペプチド様分子(好ましくは、可溶性のペプチド、および合成の非ペプチジル有機化合物また

は無機化合物)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0170】

リボザイムは、RNAの特異的な切断を触媒し得る酵素性のRNA分子である。リボザイムは、相補性の標的RNAに対する配列特異的なハイブリダイゼーション、続く内部核酸溶解性の切断によって作用する。可能性のあるRNA標的の中の特異的なリボザイム切断部位は、公知の技術によって同定され得る。さらなる詳細については、Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994)、およびPCT国際公開番号第WO97/33551号(1997年9月18日に公開された)を参照のこと。

【0171】

転写を阻害するために使用される三重ヘリックス形成における核酸分子は、一本鎖であり、そしてデオキシヌクレオチドから構成されるはずである。これらのオリゴヌクレオチドの塩基の組成は、それがHoogsteen塩基対合の法則を通じて三重ヘリックスの形成を促進するように設計される。これらは、一般には、二本鎖の一方の鎖上のプリンまたはピリミジンのかなり大きいストレッチを必要とする。さらなる詳細については、例えば、PCT国際公開番号WO97/33551号(前出)を参照のこと。

【0172】

これらの低分子は、本明細書中で上記に議論されている任意の1つ以上のスクリーニングアッセイ、および/または当業者に周知の任意の他のスクリーニング技術によって同定され得る。

【0173】

(F. 抗CHEPO抗体)

本発明はさらに、抗CHEPO抗体を提供する。例示的な抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、二重特異的抗体、および異種結合体抗体が挙げられる。

【0174】

(1. ポリクローナル抗体)

抗CHEPO抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体を

調製する方法は、当業者に公知である。ポリクローナル抗体は、哺乳動物中で、例えば、免疫薬剤および所望される場合には、アジュバントの1回以上の注射によって惹起され得る。代表的には、免疫薬剤および/またはアジュバントは、複数回の皮下または腹腔内注射によって哺乳動物に注射される。免疫薬剤は、CHEPOポリペプチドまたはその融合タンパク質を含み得る。免疫される哺乳動物中で免疫原性であることが公知のタンパク質に対して免疫薬剤を結合させることが有用であり得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、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、およびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントの例としては、フロイトの完全なアジュバント、およびMPL-TDMアジュバント(モノホスホリル脂質A、合成のトレハロースジコリノミコレート(dicorynomycolate))が挙げられる。免疫プロトコールは、過度の実験を行うことなく、当業者によって選択され得る。

【0175】

(2. モノクローナル抗体)

抗CHEPO抗体は、あるいは、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein, Nature, 256:495(1975)によって記載されているような、ハイブリドーマ方法を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法においては、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物が、代表的には、抗体を産生するかまたは抗体を産生し得るリンパ球を誘発する免疫薬剤で免疫される。これらは、免疫薬剤に対して特異的に結合する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【0176】

免疫薬剤は、代表的には、CHEPOポリペプチドまたはその融合タンパク質を含む。一般には、末梢血リンパ球(「PBL」)が、ヒト起源の細胞が所望される場合には使用されるか、または脾臓細胞もしくはリンパ節細胞が、非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合には使用されるかのいずれかである。次いで、リンパ球は、適切な融合剤(例えば、ハイブリドーマ細胞を形成するためのポリエチレングリコール)を使用して、不死化細胞株と融合される(Godding, M

onoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986)、59-103頁)。不死化細胞株は、通常は、形質転換された哺乳動物細胞であり、特に、げっ歯類、ウシ、およびヒト起源の骨髄腫細胞である。通常は、ラットまたはマウスの骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合されていない不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含有する、適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が、酵素であるヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠失している場合は、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む(「HAT培地」)。これらの物質は、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げる。

【0177】

好ましい不死化細胞株は、効率よく融合し、選択された抗体を産生する細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支持する細胞株であり、そしてこれらは、HAT培地のような培地に対して敏感である。より好ましい不死化細胞株は、マウスの骨髄腫株である。これらは、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California およびアメリカンタイプカルチャーコレクション、Manassas, Virginiaから入手することができる。ヒトの骨髄腫およびマウス-ヒトのヘテロ骨髄腫細胞株もまた、ヒトのモノクローナル抗体の産生について記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)、51-63頁)。

【0178】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、次いで、CHEPOに対して指向されたモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫

沈降によって、またはインビトロでの結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、MunsonおよびPollard, Anal, Biochem., 107:220(1980)のScatchard分析によって決定され得る。

【0179】

所望されるハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、限界希釈手順によってサブクローン化され得、そして標準的な方法によって増殖させられ得る（Goding、前出）。この目的についての適切な培養培地としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地およびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物中で腹水としてインビボで増殖され得る。

【0180】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、培養培地から単離または精製され得るか、あるいは例えば、プロテインA-Sepharose、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような、従来の免疫グロブリン精製手順によって腹水液から単離または精製され得る。

【0181】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4,816,567号に記載されているような組換えDNA方法によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来手順を使用して容易に単離されそして配列決定され得る（例えば、マウスの抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として作用する。一旦単離されると、DNAは、発現ベクター中に配置され得、これは次いで、サルのCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髄腫細胞（これらはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない）のような

宿主細胞中に、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得るために、トランスフェクトされる。DNAはまた、例えば、相同なマウスの配列の代わりに、ヒトの重鎖および軽鎖の定常ドメインのコード配列で置きかえることによって（米国特許第4,816,567号；Morrisonら、前出）、あるいは、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てまたは一部を、免疫グロブリンのコード配列に対して共有的に連結することによって、改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインで置換され得るか、またはキメラの二価抗体を作製するために、本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインで置換され得る。

【0182】

抗体は、一価の抗体であり得る。一価の抗体を調製するための方法は、当該分野で周知である。例えば、1つの方法としては、免疫グロブリン軽鎖および改変された重鎖の組換え発現が挙げられる。重鎖は、一般には、重鎖の架橋を防ぐために、Fc領域中の任意の点で短縮される。あるいは、関連するシステイン残基が、別のアミノ酸残基で置換されるか、または架橋を防ぐように欠失させられる。

【0183】

インビトロでの方法もまた、一価の抗体を調製するために適切である。そのフラグメント（特に、Fabフラグメント）を産生するための抗体の設計は、当該分野で公知の慣用的な技術を使用して達成され得る。

【0184】

（3．ヒト抗体およびヒト化抗体）

本発明の抗CHEPO抗体はさらに、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、キメラの免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはそれらのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合サブ配列）である。これらは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化抗体としては、ヒトの免疫グロブリン（レシピエント抗体）（その中で残基が、レシピエントの相補性決定領域（CDR）を形成する）が、所望される特異性、親和性、および能力を

有している非ヒト種（例えば、マウス、ラット、またはウサギ）のCDR（ドナー抗体）に由来する残基で置換される。いくつかの例においては、ヒトの免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体、および導入されたCDRまたはフレームワーク配列中のいずれにも見出されない残基を含み得る。一般には、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、そして代表的には2つの可変ドメインを実質的に全て含む。ここでは、非ヒト免疫グロブリンのものに対応する全てのまたは実質的に全てのCDR領域、およびFR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含む（Jonesら、Nature, 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature, 332:323-329(1988); およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)）。

【0185】

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。一般には、ヒト化抗体は、非ヒト供給源に由来するそれに導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「輸入」残基と呼ばれる。これらは代表的には、「輸入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、本質的には、Winterおよび共同研究者らの方法に従って、ヒト抗体の対応する配列でげっ歯類のCDR配列を置換することによって、行われ得る（Jonesら、Nature, 321:522-525(1986); Riechmannら、Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyenら、Science, 239:1534-1536(1988)）。従って、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体である（米国特許第4,816,567号）。ここでは、実質的に完全ではないヒトの可変ドメインが、非ヒト種に由来する対応する配列によって置換されている。実際、ヒト化抗体は、代表的には、その中のいくつかのCDR残基および可能性のあるいくつかのFR残基が、げっ歯類の抗体中の同様の部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。

【0186】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを含む、当該分野で公知の種々の技術を使用して産生され得る (HoogenboomおよびWinter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marksら、*J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。ColeらおよびBoernerらの技術もまた、ヒトのモノクローナル抗体の調製のために利用可能である (Coleら、*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 77頁 (1985) およびBoernerら、*J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991))。同様に、ヒト抗体は、トランスジェニック動物 (例えば、内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されているマウス) にヒトの免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって、作製され得る。チャレンジの際には、ヒト抗体の産生が観察され、これは、遺伝子の再配置、アセンブリ、および抗体のレパートリーを含む全ての点においてヒトで見られるものに非常に類似している。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,661,016号、および以下の科学文献に記載されている: Marksら、*Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonbergら、*Nature* 368, 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-813 (1994); Fishwildら、*Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); LonbergおよびHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。

【0187】

(4. 二重特異的抗体)

二重特異的抗体は、モノクローナル抗体 (好ましくは、ヒト抗体またはヒト化抗体) である。これは、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有す

る。この場合においては、1つの結合特異性は、CHEPOに対してであり、他方は、任意の他の抗原に対して、そして好ましくは、細胞表面タンパク質またはレセプターまたはレセプターサブユニットに対してである。

【0188】

二重特異的抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。伝統的には、二重特異的抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく。ここでは、2つの重鎖は異なる特異性を有する(MilsteinおよびCuello、Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな組合せに起因して、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の可能性のある混合物を生じる。これらのうちの1つだけが、正確な二重特異的構造を有する。正確な分子の精製は、通常は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順が、1993年5月13日に公開された第WO93/08829号、およびTrauneckerら、EMBO J., 10:3655-3659(1991)に開示されている。

【0189】

所望される結合特異性を有する抗体の可変ドメイン(抗体-抗原結合部位)は、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に対して融合され得る。融合体は、好ましくは、ヒンジ、CH2、およびCH3領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖の定常ドメインを有する。融合体の少なくとも1つの中に存在している軽鎖の結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH1)を有することが、好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体(および、所望される場合には、免疫グロブリン軽鎖)をコードするDNAは、別の発現ベクター中に挿入され、そして適切な宿主生物体中に同時トランスフェクトされる。二重特異的抗体の生成のさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照のこと。

【0190】

第WO96/27011号に記載されている別のアプローチに従うと、抗体分子の対の間の境界は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最

大にするように操作され得る。好ましい境界は、抗体の定常ドメインのCH3領域の少なくとも一部を含む。この方法においては、第1の抗体分子の境界に由来する1つ以上の小さいアミノ酸側鎖が、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置換される。大きな側鎖と同一であるかまたはそれと同様の大きさを補う孔が、より小さい側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）でより大きなアミノ酸側鎖を置換することによって、第2の抗体分子の境界上に作製される。これによって、ホモ二量体のような、他の所望されない最終生成物を上回るヘテロ二量体の収量を増大させるための機構を提供する。

【0191】

二重特異的抗体は、全長の抗体または抗体フラグメント（例えば、F(ab)₂二重特異的抗体）として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を生成するための技術は、文献に記載されている。例えば、二重特異的抗体は、化学的な連結を使用して調製され得る。Brennanら、Science 229:81(1985)は、インタクトな抗体がタンパク質分解によって切断されてF(ab)₂フラグメントを生じる手順を記載する。これらのフラグメントは、近隣のジチオールを安定化させ、そして分子内ジスルフィド形成を防ぐために、ジチオールを複合体化する薬剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在化で還元される。生成されたFabフラグメントは、次いで、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に転換される。Fab-TNB誘導体の1つが、次いで、メルカプトエチルアミンでの還元によってFab-チオールに再転換され、そして二重特異的抗体を形成するように等量の他のFab-TNB誘導体と混合される。産生された二重特異的抗体は、酵素の選択的な固定化のための薬剤として使用され得る。

【0192】

Fabフラグメントは、E.coliから直接回収され得、そして二重特異的抗体を形成するように化学的にカップリングされ得る。Shalabyら、J. Exp. Med. 175:217-225(1992)は、完全にヒト化された二重特異的抗体F(ab)₂分子の産生を記載している。それぞれのFabフラグメントは、E.coliから別々に分泌され、そして二重特異的抗体を形成す

るようにインビトロでの直接的な化学的なカップリングに供される。このように形成された二重特異的抗体は、E r b B 2 レセプターを過剰に発現する細胞および正常なヒトのT細胞に対して結合し得、そしてヒトの乳房腫瘍細胞標的に対してヒトの細胞傷害性のリンパ球の溶解活性を誘発する。

【0193】

組換え細胞培養物から直接二重特異的抗体フラグメントを作製しそして単離するための種々の技術もまた、記載されている。例えば、二重特異的抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている。K o s t e l n y ら、J . I m m u n o l . 1 4 8 (5) : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 (1 9 9 2) 。 F o s および J u n タンパク質に由来するロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって、2つの異なる抗体のF a b 部分に対して連結された。抗体のホモ二量体は、ヒンジ領域で還元されて単量体を形成し、そして次いで、抗体のヘテロ二量体を形成するように再度酸化された。この方法はまた、抗体ホモ二量体の産生のためにも利用され得る。H o l l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 (1 9 9 3) によって記載されているダイアボデー技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための別の機構を提供する。フラグメントは、同じ鎖上の2つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン (V_L) に連結された重鎖可変ドメイン (V_H) を含む。従って、1つのフラグメントの V_H および V_L ドメインが、別のフラグメントの相補的な V_L および V_H ドメインと対合し、それによって2つの抗原結合部位を形成するするように仕向けられる。単鎖F v (s F v) 二量体の使用により二重特異的抗体を作製するための別のストラテジーもまた、報告されている。G r u b e r ら、J . I m m u n o l . 1 5 2 : 5 3 6 8 (1 9 9 4) 。

【0194】

2つを超える結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。T u t t ら、J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 (1 9 9 1) 。

【0195】

例示的な二重特異的抗体は、本明細書中の所定のC H E P O ポリペプチド上の2つの異なるエピトープに結合し得る。あるいは、抗C H E P O ポリペプチドア

ームが、T細胞レセプター分子（例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7）、またはIgGのFcレセプター（FcR）（例えば、FcRI（CD64）、FcRII（CD32）、およびFcRIII（CD16）のような、白血球上の分子を誘発するように結合するアームと結合され得る。その結果、細胞は、特定のCHEPOポリペプチドを発現する細胞に対する細胞性の防御機構に対して集中される。二重特異的抗体はまた、特定のCHEPOポリペプチドを発現する細胞に対して細胞傷害性薬剤を局在化させるために使用され得る。これらの抗体は、CHEPO結合アーム、およびEOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETAのような細胞傷害性薬剤または放射性核種キレーターに結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的抗体は、CHEPOポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子（TF）に結合する。

【0196】

（5．ヘテロ結合体抗体）

ヘテロ結合体抗体もまた、本発明の範囲内である。ヘテロ結合体抗体は、2つの共有的に連結された抗体から構成される。このような抗体は、例えば、所望されない細胞に対して免疫システムの細胞を標的化するため（米国特許第4,676,980号）、そしてHIV感染の処置のため（第WO91/00360号；同第WO92/200373号；第EP03089号）に提案されている。抗体が、架橋剤を含む方法を含む、合成タンパク質化学における公知の方法を使用してインビトロで調製され得ることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって、構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに、例えば、米国特許第4,676,980号に開示されている試薬が挙げられる。

【0197】

（6．エフェクター機能の操作）

例えば、ガンの処置における抗体の有効性を増強するために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を改変することが所望され得る。例えば、システイン残基が、Fc領域に導入され得、それによってこの領域中での鎖間ジスルフィド結

合形成を可能にする。このように生成されたホモ二量体抗体は、改善されたインターナライゼーション能力、ならびに/または増大させられた補体によって媒介された細胞殺傷、および抗体依存性の細胞性細胞傷害性(ADCC)を有し得る。Caronら、*J. Exp. Med.* 176:1191-1195(1992)およびShopes, *J. Immunol.* 148:2918-2922(1995)を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体もまた、Wolffら、*Cancer Research*, 53:2560-2565(1993)に記載されているようなヘテロ二官能性の架橋リンカーを使用して調製され得る。あるいは、二重のFc領域を有し、そしてそれによって増強された補体溶解およびADCC能力を有し得る抗体が、操作され得る。Stevensonら、*Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230(1989)を参照のこと。

【0198】

(7. 免疫結合体)

本発明はまた、化学療法剤、毒素(例えば、酵素的に活性である、細菌、真菌、植物、または動物起源の毒素、あるいはそれらのフラグメント)あるいは放射活性な同位元素(例えば、放射活性結合体)のような細胞傷害性の薬剤に対して結合体化した抗体を含む、免疫結合体に関する。

【0199】

このような免疫結合体の生成に有用な化学療法剤が、上記に記載されている。使用され得る酵素的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、以下が挙げられる:ジフテリアのA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、エキソトキシンA鎖(*Pseudomonas aeruginosa*由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modecin)A鎖、-サリシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、*Phytolaca americana*タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、*momordica charantia*インヒビター、カルシン(carcin)、クロチン(crotin)、*saponaria officinalis*インヒビター、ゲロニン、ミトギリン(

mitogelin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)、およびトリコセシン(tricothecene)。種々の放射性核種が、放射活性を結合された抗体の産生に利用可能である。例としては ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が挙げられる。

【0200】

抗体と細胞傷害性薬剤との結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤(例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジピミデート(dimethyladipimidate)(HCL))、活性なエステル(例えば、ジスクリンイミジルスベレート)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン))を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science, 238:1098(1987)に記載されているように調製され得る。炭素-14-標識1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)が、抗体に対する放射性核種の結合のための例示的なキレート剤である。第WO94/11026号を参照のこと。

【0201】

別の実施形態においては、抗体は、腫瘍の予備標的化における利用のための「レセプター」(例えば、ストレプトアビジン)に対して結合され得る。ここでは、抗体-レセプター結合体が患者に対して投与され、続いて、キレート剤を使用して循環から結合していない結合体が除去され、次いで、細胞傷害性薬剤(例えば、放射性核種)に対して結合させられた「リガンド」(例えば、アビジン)の投与が行われる。

【0202】

(8. 免疫リポソーム)

本明細書中に開示されている抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含有するリポソームが、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); ならびに米国特許第4,485,045号、および同第4,544,545号に記載されているように、当該分野で公知の方法によって調製される。循環時間が増強されたリポソームが、米国特許第5,013,556号に開示されている。

【0203】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEGで誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いて、逆相蒸発方法によって生成され得る。リポソームは、所望される直径を有するリポソームを得るために、規定された孔の大きさのフィルターを通じて押し出される。本発明の抗体のFab'フラグメントは、Martinら、J. Biol. Chem., 257:286-288(1982)に記載されているように、ジスルフィド鎖間反応を通じてリポソームに対して結合体化され得る。化学療法剤(例えば、ドキソルビシン)が、必要に応じて、リポソーム中に含まれる。Gabizonら、J. National Cancer Inst., 81(19):1484(1989)を参照のこと。

【0204】

(9. 抗体の薬学的組成物)

本明細書中で同定されたCHEPOポリペプチドに特異的に結合する抗体、ならびに本明細書中で上記で開示されるスクリーニングアッセイによって同定された他の分子が、薬学的組成物の形態で種々の障害の処置のために投与され得る。

【0205】

CHEPOポリペプチドが細胞内にあり、そして抗体全体がインヒビターとして使用される場合は、インターナライズ抗体は好ましい。しかし、リポフェクションまたはリポソームもまた、細胞中に抗体または抗体フラグメントを送達するために使用され得る。抗体フラグメントが使用される場合は、標的タンパク質の

結合ドメインに特異的に結合する最も小さい阻害性フラグメントが好ましい。例えば、抗体の可変領域の配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持しているペプチド分子が設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得、および/または組換えDNA技術によって産生され得る。例えば、Marascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 (1993)を参照のこと。本明細書中の処方物もまた、処置される特定の指標に必要である場合、1つを超える活性な化合物（好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補活性を有する化合物）を含み得る。あるいは、またはさらに、組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、化学療法剤、または増殖阻害因子）を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で組合せられて、適切に存在する。

【0206】

有効成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、または境界の重合（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース、またはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）によって調製されたマイクロカプセル中に、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）中に、またはマイクロエマルジョン中に捕捉され得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、前出に開示されている。

【0207】

インピボでの投与に使用される処方物は、滅菌でなければならない。これは、滅菌の濾過膜を通じた濾過によって容易に達成される。

【0208】

徐放調製物が調製され得る。徐放調製物の適切な例としては、抗体を含む固体の疎水性ポリマーの半透性のマトリックスが挙げられる。このマトリックスは、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルのような、成形された物の形態である。徐放マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、

ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性のエチレンビニルアセテート、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、LUPRON DEPOT（登録商標））（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）、およびポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日を越えて分子を放出することが可能であるが、特定のヒドロゲルは、より短い期間の間タンパク質を放出する。カプセル化された抗体が長期間の間体内に留まる場合は、これらは、37℃で水分に対する暴露の結果として、変性し得るかまたは凝集し得、それによって生物学的活性の欠失および免疫原性における可能性のある変化を生じる。合理的なストラテジーが、関与する機構に依存して安定化のために考案され得る。凝集機構が例えば、チオ-ジスルフィド交換を通じた分子内S-S結合の形成であると発見される場合は、安定化は、スルフヒドリル残基を改変すること、酸性の溶液から凍結乾燥させること、水分含有量を制御すること、適切な添加剤を使用すること、および特異的なポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成され得る。

【0209】

（G. 抗CHEPO抗体の使用）

本発明の抗CHEPO抗体は、種々の有用性を有する。例えば、抗CHEPO抗体は、CHEPOの診断アッセイ（例えば、特定の細胞、組織、または血清中でのその発現を検出すること）において使用され得る。当該分野で公知の種々の診断アッセイ技術（例えば、競合結合アッセイ、直接または間接的なサンドイッチアッセイ、および不均質な相または均質な相のいずれかの中で行われる免疫沈降アッセイ）が使用され得る。（Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987)、147-158頁）。診断アッセイにおいて使用される抗体は、検出可能な部分を用いて標識され得る。検出可能な部分は、直接または間接的に、検出可能なシグナルを産生し得るはずである。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、または¹²⁵I）、

蛍光、または化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリン）、あるいは酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る。検出可能な部分に対して抗体を結合体化するための当該分野で公知の任意の方法が使用され得る。これらとしては、Hunterら、*Nature*, 144: 945 (1962); Davidら、*Biochemistry*, 13: 1014 (1974); Painら、*J. Immunol. Meth.*, 40: 219 (1981); およびNygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407 (1982) によって記載されている方法が挙げられる。

【0210】

抗CHEPO抗体はまた、組換え細胞培養物または天然の供給源からのCHEPOのアフィニティー精製のために有用である。このプロセスにおいては、CHEPOに対する抗体は、適切な支持体（例えば、Sephasex樹脂または濾紙）上に、当該分野で周知の方法を使用して固定化される。次いで、固定化された抗体は、精製されるCHEPOを含むサンプルと接触させられ、その後、支持体が、固定された抗体に結合させられていCHEPOを除く、サンプル中の実質的に全ての材料を除去する適切な溶媒で洗浄される。最後に、支持体が、抗体からCHEPOを解離させる別の適切な溶媒で洗浄される。

【0211】

以下の実施例は、説明の目的のみのために与えられ、そしていかなる方法においても本発明の範囲を限定することは意図されない。

【0212】

本明細書中に引用されている全ての特許および参考文献は、それらの全体において参考として本明細書中で援用されている。

【0213】

（実施例）

本実施例において言及する市販の試薬は、特に記載していない場合を除き、製造業者の使用説明書に従って使用した。以下の実施例中および本明細書中全体を

通してATCC受託番号により示す細胞の供給源は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (Manassas, VA) である。

【0214】

(実施例1: CHEPOをコードする核酸の単離)

製造業者の使用説明書に推奨されるように、Qiagenキット (cat # 10262) を用いて、2種のチンパンジーの細胞株 (ATCC CRL 1609およびCRL 1857) よりゲノムDNAを単離した。次いで、チンパンジーEpo遺伝子を、鋳型として1gのゲノムDNAおよび以下のプライマー対を用いたPCRによって、3つの異なるフラグメント上で得た。

EPO.F: 5' - ACCGCGCCCCCTGGACAG - 3' (配列番号12)

EPO.INT1.R: 5' - CATCCACTTCTCCGGCCAAAC TTCA - 3' (配列番号13)

EPO.INT1F: 5' - TTTGGCCGGAGAAGTGGATGC - 3' (配列番号14)

EPO.INT4R: 5' - TCACTCACTCACTCATTCA TTCA TTCA - 3' (配列番号15)

EPO.INT4F: 5' - GTTGAATGAATGATTGAATGAAT GAGTGA - 3' (配列番号16)

EPO.R: 5' - GCACTGGAGTGTCCATGGGACAG - 3' (配列番号17)

各PCRの反応系を、10×PCR緩衝液 (Perkin Elmer) を5 l、dNTP (20mM) を1 l、ゲノムDNAを1 g、各プライマー対を1 l、Taqポリメラーゼ (Clontech) を1 l含み、H₂Oで全体積を50 lにした。反応はまず94 で4分変性させた後、94 で1分、65 もしくは66 で1分、72 で1分の伸長を40回繰り返して増幅した。最後に72

で5分の伸長工程を行った。次いで、反応物をアガロースゲルを用いて分析した。それぞれ500 bp、1200 bp、および750 bpのPCR産物が観察された。次いで、PCR反応物を、Wizard kit (Promega c

at# A7170)を用いて精製した後、直接配列決定を行った。PCR産物のDNA配列決定は、Applied Biosystems 377 DNA Sequencer (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて行った。用いた化学反応は、dRhodamineおよびBIG DYEターミネーター (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いる色素ターミネーターサイクル配列決定法 (DYE Terminator Cycle Sequencing)であった。配列アセンブリおよび編集はSequencher software (Gene Codes, Ann Arbor, MI)で行った。

【0215】

ヒトエリスロポエチンの配列との相同性によって5つのエクソンコードを同定し、推定全長cDNAへと組み立てた。CHEPO cDNAのコード領域は579bpヌクレオチド長 (図1)で193アミノ酸の推定タンパク質をコードする (図3)。また22、24、27番目のアミノ酸残基の後ろに予測される3つの推定シグナル切断部位がある。ヒトEpoのN末端配列と一致すると、おそらく、最後のものがチンパンジーEpoの切断部位に対応する。疎水性の27アミノ酸のシグナルペプチドの後ろに3つの推定Nグリコシル化部位を含む166アミノ酸長の成熟タンパクを有する。CRL1609から得た推定配列中には1ヌクレオチド多型が存在しており、これは142位のアミノ酸をQからKへとタンパク質配列を変更する。チンパンジーEpoタンパクとヒトEpoの配列とを整列させると84番目のアミノ酸がただ1つ異なっていることを示す (図3)。

【0216】

(実施例2:ハイブリダイゼーション用プローブとしてのCHEPO cDNAの使用)

以下の方法はハイブリダイゼーション用プローブとしてのCHEPOをコードするヌクレオチド配列の使用を記載する。

【0217】

ヒト組織cDNAライブラリー中もしくはヒト組織ゲノムライブラリー中における相同なDNA (CHEPOの天然の改変体をコードするもの)のスクリーニ

ング用プローブとして、全長もしくは成熟CHEPO (図2の配列番号3に示す)のコード配列を含むDNAを利用する。

【0218】

いずれかのDNAライブラリーを含むフィルターのハイブリダイゼーションおよび洗浄は以下の高ストリンジェンシー条件下で行う。放射性標識したCHEPO由来のプローブのフィルターへのハイブリダイゼーションは50%ホルムアミド、5×SSC、0.1% SDS、0.1% ピロリン酸ナトリウム、50mM リン酸ナトリウム、pH6.8、2×デンハルト溶液そして10% 硫酸デキストラン中、42℃で20時間行う。フィルターの洗浄を、0.1×SSCおよび0.1% SDSを含む水溶液中、42℃で行う。

【0219】

次いで、ネイティブなCHEPO全長配列をコードするDNAと所望の配列同一性を有するDNAは、当該分野で公知の標準的な技術を用いて同定できる。

【0220】

(実施例3：E. coliにおけるCHEPOの発現)

本実施例では、E. coliにおける組み換え発現による非グリコシル化型CHEPOの調製について示す。

【0221】

まず、選択したPCRプライマーを用いてCHEPOをコードするDNA配列(図3)を増幅する。プライマーは選択した発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位を含むべきである。種々の発現ベクターが使用可能である。適したベクターの例は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性遺伝子を含むpBR322(E. coli由来：Balivarら, Gene, 2:95(1977)参照)である。ベクターを制限酵素で消化し、脱リン酸化する。次いで、PCR増幅した配列をベクター中に連結する。好ましくは、ベクターは抗生物質耐性遺伝子をコードする配列、trpプロモーター、ポリHisリーダー(最初の6個のSTIIコドン、ポリHis配列、エンテロキナーゼ切断部位を含む)、CHEPOコード領域、転写ターミネーター、そしてargU遺伝子を含む。

【0222】

次いで、連結混合物を、Sambrookら（前出）に示されている方法を用いて、選択したE. coliを形質転換するために使用する。形質転換体を、LBプレート上での生育能により同定し、次いで抗生物質耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し得、そして制限酵素処理およびDNA配列決定によって同定し得る。

【0223】

選択したクローンを、抗生物質を含むLBブロスなどの液体培養培地中で一晚増殖し得る。一晚増殖した培養物を、続いてより大きなスケールの培養へと接種するために使用する。次いで、細胞を所望の光学密度まで増殖させ、この間に発現プロモータースイッチが入る。

【0224】

細胞をさらに数時間培養した後、遠心分離により細胞を回収する。遠心分離により得られたペレットを当該分野で公知の種々の試薬を用いて可溶化し、次いで、可溶化したCHEPOタンパク質を、タンパク質が強く結合する条件で金属キレートカラムを用いて精製し得る。

【0225】

CHEPOは以下に示す手法を用いてポリHisタグ化形態でE. coliで発現させ得る。まず、選択したPCRプライマーを用いてCHEPOをコードするDNAを増幅する。プライマーは選択した発現ベクター上にある制限酵素部位に対応する制限酵素部位を有しており、また、効率的かつ信頼性の高い翻訳開始、金属キレートカラムによる迅速な精製およびエンテロキナーゼによるタンパク質分解除去を提供する有用な他の配列を含む。次いで、ポリHisタグ化したPCR増幅した配列を、発現ベクターに連結し、52株(W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoH ts(htpR ts) clpP(lacI q))に基づいたE. coli宿主を形質転換するために用いる。まず、形質転換体を、50 mg/mlのカルベニシリンを含むLB培地中において30でO.D. 600が3~5になるまで振盪培養する。次いで、培養物をCRAP培地(3.57 g (NH₄)₂SO₄、0.71 g クエン酸ナトリウム2H₂O

、1.07 g KCl、5.36 g Difco酵母抽出物、5.36 g Sheffield hycase SFを500mLの水に、110 mMのMPOS、pH7.3、0.55% (w/v)のグルコースおよび7mMの硫酸マグネシウムを混合することによって調製する)中で50~100倍に希釈し、30で約20~30時間振盪培養する。SDS-PAGEで発現を確認するために、サンプルを取り出し、バルク培養物を遠心分離し、細胞をペレットにする。細胞のペレットは、精製およびリフォールディングを行うまで凍結保存する。

【0226】

0.5~1Lの培養物からのE.coliペースト(6~10gのペレット)を10容量(w/v)の7M グアニジンを含む20mM Tris緩衝液(pH8)中に再懸濁する。固体の亜硫酸ナトリウムおよびテトラチオン酸(tetrathionate)ナトリウムをそれぞれ終濃度0.1Mおよび0.02Mとなるように添加し、溶液を4で一晩攪拌する。この工程により全てのシステイン残基を亜硫酸化(sulfitolization)によって保護された変性タンパクが生じる。この溶液をBeckman Ultracentrifugeを用いて40,000rpmで30分遠心分離する。上清を3~5容量の金属キレートカラム用緩衝液(6M グアニジン、20mM トリス緩衝液(pH7.4))で希釈し、0.22ミクロンのフィルターを用いて濾過し、清澄化する。清澄化した抽出物を、金属キレートカラム用緩衝液で平衡化した5mlのQiagen Ni-NTA金属キレートカラムに供する。カラムを50mMイミダゾール(Calbiochem, Utrol grade), pH 7.4を含むさらなる緩衝液で洗浄する。250mM イミダゾールを含む緩衝液を用いてタンパクを溶出させる。所望のタンパク質を含む画分をプールし、4で保存する。タンパク質濃度はそのアミノ酸配列に基づいて計算された吸光係数を用いて280nmの吸光度より算出する。

【0227】

タンパク質のリフォールディングは、新たに調製した20mM トリス、pH8.6、0.3M NaCl、2.5M 尿素、5mM システイン、20mM グリシンおよび1mM EDTAを含むリフォールディング緩衝液中にサンプ

ルをゆっくり希釈して行う。リフォールディング体積はタンパク質の終濃度が50～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように選択する。リフォールディング溶液は4で12～36時間緩やかに攪拌する。リフォールディング反応は終濃度0.4%になるようTFA (pHは約3) を添加して止める。さらなるタンパク質精製の前に、溶液を0.22ミクロンのフィルターで濾過し、終濃度2～10%のアセトニトリルを添加する。リフォールディングされたタンパク質はPoros R1/H 逆相カラムで、移動緩衝液は0.1% TFAを用い、アセトニトリル10～80%のグラジエントにより溶出させるクロマトグラフィーにかける。A280の吸光を示す画分のアリコートでSDS-ポリアクリルアミドゲルにより分析し、均一にリフォールディングされたタンパク質をまとめる。一般に正しくリフォールディングされた種のタンパク質のほとんどは、疎水性内部が逆相カラム担体との相互作用から保護されている最もコンパクトな状態にあるため、最も低いアセトニトリル濃度で溶出する。凝集した種は通常、高アセトニトリル濃度で溶出する。ミスフォールドされたタンパク質を所望の形態から分離することに加えて、逆相工程はまた、エンドトキシンをサンプルから除去する。

【0228】

望ましくフォールドされたCHEPOポリペプチドを含む画分をまとめ、溶液に緩やかに窒素ガスを注入してアセトニトリルを除去する。タンパク質を0.14M 塩化ナトリウムおよび4% マンニトールを含む20mM HEPES, pH6.8緩衝液で透析するか、もしくはこの緩衝液で平衡化されたG25 Superfine (Pharmacia) 樹脂を用いたゲル濾過カラムにより処方し、滅菌濾過する。

【0229】

(実施例4：哺乳動物細胞内におけるCHEPOの発現)

本実施例では、哺乳動物細胞内での組み換え発現によって潜在的にグリコシル化型のCHEPOの調製について示す。

【0230】

発現ベクターとしてベクターpRK5 (EP 307, 247参照。1989年3月15日公開) を採用する。必要に応じて、CHEPO DNAは選択した

制限酵素部位でSambrookら(前出)に記載されている連結方法を用いてpRK5中に連結してCHEPO DNAの挿入を可能にする。得られたベクターはpRK5-CHEPOと称する。

【0231】

一つの実施形態において、選択した宿主細胞は293細胞であり得る。ヒト293細胞(ATCC CCL 1573)は、ウシ胎仔血清、場合により栄養成分および/もしくは抗生物質を含む培地(例えば、DMEM)で組織培養プレート中でコンフルエントになるまで増殖させる。約10gのpRK5-CHEPO DNAは、約1gのVA RNA遺伝子をコードするDNA[Thimmapayaら, Cell, 31:543(1982)]と混ぜ、500lの1mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、0.227M CaCl₂溶液中に溶解する。この混合物に500lの50mM HEPES(pH7.5)、280mM NaCl、1.5mM NaPO₄溶液を滴下し、25℃で10分間沈殿を形成させる。沈殿物を懸濁した後、293細胞に添加し、37℃で約4時間沈澱させる。培養培地を吸引して除去し、2mlの20%グリセロールPBS溶液を30秒間で添加する。次いで、293細胞を無血清培地で洗浄し、新たな培地を添加して細胞を約5日間培養する。

【0232】

トランスフェクションして約24時間、培養培地を除去し、培養培地単独または200Ci/ml ³⁵S-システインおよび200Ci/ml ³⁵S-メチオニンを含む培養培地に置き換える。12時間培養した後、馴化培地を集めてスピンドフィルターにより濃縮し、15% SDSゲルに供する。処理したゲルを乾燥し、CHEPOポリペプチドの存在を調べるため、ある決められた時間フィルムに感光させ得る。トランスフェクションした細胞を含む培養物をさらに(無血清培地中で)培養し、培地を決められたバイオアッセイにより調べる。

【0233】

別の手法としては、CHEPOをSomparacra(Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575(1981))に記載の硫酸デキストラン法を用いて一過性に293細胞に導入し得る。293細胞をスピナーフラス

コ中で最大濃度まで培養させ、700 gのpRK5 - CHEPO DNAを添加する。細胞をまず遠心分離して、スピナーフラスコから濃縮し、PBSで洗浄する。DNA - デキストラン沈殿物を菌体ペレット上で4時間インキュベートする。細胞を20%グリセロールで90秒間処理し、組織培養培地で洗浄し、組織培養培地、5 g/ml ウシインスリンおよび0.1 g/ml ウシトランスフェリンの入ったスピナーフラスコ中に再び導入する。およそ4日後、馴化培地を遠心分離し、濾過により細胞、細胞片を除く。次いで、発現したCHEPOを含むサンプルは透析および/もしくはカラムクロマトグラフィーのような任意の選択した手法を用いて濃縮および精製する。

【0234】

別の実施形態では、CHEPOをCHO細胞中で発現させ得る。pRK5 - CHEPOはCaPO₄またはDEAE - デキストランのような公知の試薬を用いてCHO細胞中にトランスフェクトし得る。上記のように、細胞培養物をインキュベートし、培地を培養培地(単独)または例えば、放射性標識した³⁵S - メチオニンを含む培地で置き換え得る。CHEPOポリペプチドの存在を確認した後、培養培地を無血清培地に交換し得る。好ましくは、この培養物を、約6日間インキュベートし、次いで、馴化培地を回収する。次いで、発現したCHEPOを含む培地を、任意の選択した手法により濃縮、精製する。

【0235】

また、エピトープタグ化CHEPOを宿主CHO細胞中で発現し得る。CHEPOはpRK5ベクターからサブクローニングし得る。サブクローニングした挿入物を、PCRによってポリHisタグのような選択したエピトープタグと共にバキュロウイルス発現ベクターにインフレイムで融合させ得る。次いで、ポリHisタグ化CHEPO挿入物を、DHFRなどの選択マーカを含むSV40由来のベクター中に安定したクローンを選択するためにサブクローニングし得る。最後に、CHO細胞を(前述のように)SV40由来ベクターとトランスフェクションし得る。前述のように発現を確認するために標識してもよい。次いで、発現させたポリHisタグ化CHEPOを含む培養培地を、Ni²⁺キレートアフィニティークロマトグラフィーのような種々の選択した手法を用いて濃縮および精

製し得る。

【0236】

また、CHEPOは一過性の発現手法によってCHO細胞および/もしくはCOS細胞中、また別の安定な発現手法によってCHO細胞中で発現させ得る。

【0237】

次に示す手法によりCHO細胞中で安定な発現を行う。タンパク質をIgG構築物(イムノアドヘシン)として発現し(ここで、各タンパク質の可溶性形態のためのコード配列(例えば、細胞外ドメイン)は、ヒンジ領域、CH2およびCH2ドメインを有するIgG1の定常領域配列と融合している)、および/またはこの発現は、ポリHisタグ化型である。

【0238】

PCRによる増幅に続き、それぞれのDNAフラグメントを、標準的な技術(Ausubelら, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons(1997)を参照のこと)を用いてCHO発現ベクター中にサブクローニングする。CHO発現ベクターを、cDNAのシャトル(shuttle)に便利になるよう、目的のDNAの5'位および3'位の制限部位への適合性を有するように構築する。CHO細胞中での発現に使用したベクターはLucasら(Nucl. Acids Res, 24:9(1774-1779(1996))に記載のものであり、目的のcDNAおよびジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の発現を駆動するためのSV40の初期プロモーター/エンハンサーを使用する。DHFRの発現によって、トランスフェクションの後のプラスミドの安定な維持に関する選択が可能となる。

【0239】

12 µgの所望のプラスミドDNAを、市販のトランスフェクション試薬であるSuperfect(Qiagen)、DospoもしくはFugene(Boehringer Mannheim)を用いて約1000万個のCHO細胞中に導入する。細胞はLucasら(前述)によって示されているように増殖させる。約 3×10^7 の細胞を、以下に示すさらなる増殖および生成のためにア

ンプル中で冷凍する。

【0240】

プラスミドDNAを含むアンプルを、水浴に入れて解凍し、ボルテックスにより混合する。内容物をピペットで10mlの培地の入った遠心管に移し1000rpmで5分の間、遠心分離する。上清を吸引して除いた後、細胞を、10mlの選択培地(0.2µmのフィルターで濾過したウシ胎仔血清を5%含む0.2µmのフィルターで濾過したPS20)中に再懸濁する。次いで、細胞を90mlの選択培地の入った100mlスピナーにアリコートに分ける。1~2日後、選択増殖培地を150ml含む250mlスピナーフラスコ中に細胞を移し、37℃でインキュベートする。さらに2~3日後、250ml、500mlおよび2000mlのスピナーフラスコ中に 3×10^5 細胞/mlを播種する。細胞培地を、遠心分離および生成培地への再懸濁により新たな培地に交換する。任意の適切なCHO培地が使用可能であるが、米国特許第5,122,469号(1992年6月18日発行)に記載されているものを実際には使用する。3Lの産生スピナー中に 1.2×10^6 細胞/mlで播種する。0日目に、菌体数、pHを測定する。1日目、スピナーからサンプリングを行い、フィルター濾過した空気の散布を始める。2日目、スピナーからサンプリングを行う。温度を33℃にし、500g/Lのグルコース30mlと0.6mlの10%消泡剤(例えば、35%ポリジメチルシロキサンエマルジョン(Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion))を添加する、生産期間全体を通じて、pHは、必要に応じて約7.2に維持するように調整する。10日後、もしくは生存率が70%未満に低下した後、細胞培養物を遠心分離して集菌し、0.22µmのフィルターで濾過する。濾液を、各々4℃で保存するかすぐに精製カラムに供するかのいずれかである。

【0241】

ポリヒスタグ化構築物に関しては、Ni-NTAカラム(Qiagen)を用いてタンパク質を精製する。精製前に、5mMの濃度になるまでイミダゾールを馴化培地に添加する。馴化培地を、ポンプを用いて0.3M NaCl、5mM イミダゾールを含む20mM HEPES緩衝液(pH7.4)で平衡化し

た6 mlのNi-NTAカラムに4、流速4.5 ml/分で導入する。導入した後、さらに平衡化緩衝液でカラムを洗浄し、0.25 M イミダゾールを含む平衡化緩衝液を用いてタンパク質を溶出させる。続いて、高度に精製したタンパク質を、25 ml G25 Superfine (Pharmacia) カラムを用いて、10 mM HEPES、0.14 M NaCl、および4% マンニトールを含む保存緩衝液 (pH 6.8) に脱塩し、-80 で保存する。

【0242】

イムノアドヘシン (Fc含有) 構築物を、馴化培地から以下に示す方法で精製する。馴化培地はポンプを用いて20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で平衡化した5 ml のプロテインA カラム (Pharmacia) に供する。ロードした後、pH 3.5の100 mM クエン酸で溶出する前に、平衡化緩衝液を用いてカラムを徹底的に洗浄する。溶出したタンパク質は、275 Lの1 M Tris緩衝液 (pH 9) を含むチューブ中に1 mlの画分を回収して直ちに中和する。続いて、ポリHisタグ化したタンパク質について上に記載したようにして、高度に精製したタンパク質を保存緩衝液中に脱塩する。均一性をSDS-ポリアクリルアミドゲルおよびエドマン分解を用いたN末端アミノ酸配列決定によって評価する。

【0243】

(実施例5：酵母内におけるCHEPOの発現)

以下の方法は、酵母内におけるCHEPOの組み換え発現について示す。

【0244】

まず、酵母内発現ベクターは、ADH2 / GAPDHプロモーターによるCHEPOの細胞内産生、もしくは分泌を目的として設計する。CHEPOをコードするDNAおよびプロモーターは、CHEPOの細胞内発現を行わせるために選択したプラスミド中の適切な制限酵素部位に挿入する。分泌に関しては、CHEPOをコードするDNAを、ADH2 / GAPDHプロモーターをコードするDNAとともに、ネイティブなCHEPOのシグナルペプチドもしくは他の哺乳動物のシグナルペプチドもしくは、例えば、酵母の因子もしくはインベルターゼ

分泌シグナル/リーダー配列、そして(必要であれば)CHEPOの発現のためのリンカー配列を選択したプラスミド中にクローニングし得る。

【0245】

次いで、酵母細胞、例えば酵母液AB110を、上記の発現用プラスミドを用いて形質転換し得、また選択発酵培地中で培養し得る。形質転換された酵母の上清は、10% トリクロロ酢酸を用いた沈殿によって分析でき、そしてSDS-PAGEの後、クーマシーブルー染色でゲルを染色することによって分離できる。

【0246】

続いて、組み換えCHEPOを遠心分離により発酵培地から酵母細胞を除去し、次いで、選択したカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮することで分離および精製し得る。CHEPOを含む濃縮液を、選択したカラムクロマトグラフィ樹脂を用いてさらに精製し得る。

【0247】

(実施例6：バキュウロウイルスを感染させた昆虫細胞内におけるCHEPOの発現)

以下の方法は、バキュウロウイルスを感染させた昆虫細胞内におけるCHEPOの組み換え発現について示す。

【0248】

CHEPOをコードする配列を、バキュウロウイルス発現ベクターに含まれる、エピトープタグの上流に融合する。このようなエピトープタグはポリHisタグおよび(IgGのFc領域のような)免疫グロブリンタグを含む。pVL1393(Novagen)などの市販品のプラスミド由来のプラスミドを含む種々のプラスミドが使用可能である。簡単に述べると、CHEPOをコードする配列もしくはその望ましい部分、例えば膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列またはタンパク質が細胞外のものであればその成熟タンパク質をコードする配列を、5'領域および3'領域と相補的なプライマーを用いるPCRにより増幅する。5'プライマーは隣接した(選択した)制限酵素部位を含む。次いで、産物をそれらの選択した制限酵素で消化し、発現ベクターにサブクローニ

ングする。

【0249】

組み換えバキュロウイルスは上記のプラスミドおよびBaculoGold™ウイルスDNA(Phamingen)をリポフェクチン(GIBCO-BRLより市販)を用いてSpodoptera frugiperda(「Sf9」)細胞(ATCC CRL 1711)に対して同時トランスフェクションすることで作製する。28℃で4~5日インキュベートした後、放出したウイルスを回収し、さらに増幅するために使用する。ウイルスの感染およびタンパク質の発現はO'Reillyら(Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press(1994))に記載されるように行う。

【0250】

次いで、発現させたポリHisタグを有するCHEPOを、例えばNi²⁺キレートアフィニティークロマトグラフィーによって以下のように精製し得る。抽出物を、組み換えウイルスを感染させたSf9細胞からRupertら(Nature. 362: 175-179(1993))に記載されるように調製する。簡単に述べると、Sf9細胞を洗浄し、超音波破碎用緩衝液(25mL Heps, pH7.9; 12.5mM MgCl₂; 0.1mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1% NP-40; 0.4M KCl)中に再懸濁し、氷上で20秒間の超音波破碎を2度繰り返す。破碎液を遠心分離し、上清をローディング緩衝液(50mM リン酸、300mM NaCl、10%グリセロール、pH7.8)で50倍に希釈し、0.45μmフィルターを用いて濾過する。総ベッド体積5mLでのNi²⁺-NTA-アガロースカラム(Qiagenより市販)を調製し、25mLの水で洗浄し、25mLのローディング緩衝液で平衡化する。濾過した細胞抽出液は0.5mL/分でカラムに供する。ローディング緩衝液を用いてA₂₈₀ベースラインまでカラムを洗浄し、この時点で画分の回収を開始する。次にカラムを非特異吸着タンパク質を溶出させる二次洗浄緩衝液(50mM リン酸; 300mM NaCl、10%グリセロール、pH6.0

)で洗浄する。再度 A_{280} ベースラインまで達した後、カラムを二次洗浄緩衝液中0~500mM イミダゾール勾配で展開する。1mLの画分を回収し、SDS-PAGEの後、銀染色もしくは Ni^{2+} -NTAアルカリフォスファターゼ(Qiagen)を用いたウエスタンブロッティングによって分析する。His₁₀タグが結合したCHEPOを含む画分をプールし、ローディング緩衝液で透析する。

【0251】

あるいは、IgGタグ(もしくはFcタグ)のついたCHEPOの精製を、公知のクロマトグラフィー技術(例えばプロテインAもしくはプロテインGカラムのクロマトグラフィーを含む)を用いて行い得る。

【0252】

(実施例7: CHEPOと結合する抗体の調製)

本実施例は、特異的にCHEPOと結合し得るモノクローナル抗体の調製法について示す。

【0253】

モノクローナル抗体を生成する技術は当該分野で公知であり、例えばGodin(前出)に示されている。使用し得る免疫原は精製したCHEPO、CHEPOを含む融合タンパク質および細胞表面で組換えCHEPOを発現する細胞を含む。免疫原の選択は、当業者によって過度な実験を行うことなく行われ得る。

【0254】

マウス(Balb/cなど)はフロイント完全アジュバント中で乳化したCHEPO免疫原を皮下もしくは腹腔に1~100 μ gの量注射することによって免疫する。あるいは、免疫原をMPL-TDMアジュバント(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)内で乳化して動物の後肢肉球に注射する。次いで、免疫したマウスを、10~12日後に、選択したアジュバント内で乳化した免疫原を用いて追加免疫する。次いで、数週間後、またマウスにさらに免疫注射を行い、追加免疫を行ってもよい。ELISAアッセイで試験するため、抗CHEPO抗体を検出するために眼窩後部採血によって血清サンプルを定期的にマウスから採取する。

【0255】

適切な抗体力価が検出された後、抗体「陽性」の動物は最終的なCHEPOの静脈中注射を受け得る。3～4日後、マウスを屠殺し、その脾細胞を収集する。次いで、脾細胞を(35% ポリエチレングリコールを用いて)選択したマウス骨髓腫細胞株(例えばP3X63AgU.1(ATCCより入手可能(No. CRL 1597)))と融合させる。融合物からハイブリドーマ細胞が生じ、次いで、それらを非融合細胞、骨髓腫ハイブリッド細胞および脾ハイブリッド細胞の増殖を阻害するために、HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレート上に撒く。

【0256】

ハイブリドーマ細胞はCHEPOに対する反応性についてELISAによって選抜する。CHEPOに対して所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」なハイブリドーマ細胞を決定することは、当業者の技術範囲内である。

【0257】

陽性のハイブリドーマ細胞は抗CHEPOモノクローナル抗体を含む腹水を生成する同系Balb/cマウス腹腔内に注射され得る。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、細胞培養用フラスコもしくは回転ビン中で生育させ得る。腹水中で生成されたモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム沈殿、続いてサイズ排除ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて達成し得る。あるいは、プロテインAもしくはプロテインGへの抗体の結合性を利用したアフィニティークロマトグラフィーも使用し得る。

【0258】

(実施例8：特異的抗体を用いたCHEPOポリペプチドの精製)

ネイティブもしくは組み換えCHEPOポリペプチドは、当該分野で標準的な種々のタンパク質精製技術により精製され得る。例えば、プロCHEPOポリペプチド、成熟CHEPOポリペプチド、もしくはプレCHEPOポリペプチドは、目的のCHEPOポリペプチドに特異的な抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。一般に、イムノアフィニティークラムは抗CHEPOポリペプチド抗体を活性化したクロマトグラフィー樹脂に共有結合さ

せることにより構築される。

【0259】

ポリクローナル免疫グロブリンは硫酸アンモニウム沈澱または固定化したプロテインA (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N. J.) での精製のいずれかにより免疫性の血清より調製される。同様にモノクローナル抗体は、マウスの腹水から硫酸アンモニウム沈澱または固定化したプロテインAのクロマトグラフィーによって調製される。部分精製された免疫グロブリンはCnBrで活性化されたSEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology) のようなクロマトグラフィー樹脂に対して共有結合させる。抗体は樹脂と結合し、樹脂はブロックされ、誘導体化した樹脂を製造業者の取扱説明書に基づいて洗浄する。

【0260】

このようなイムノアフィニティーカラムは、CHEPOポリペプチドを可溶化形態で含む細胞から画分を調製することによりCHEPOポリペプチドの精製を行う際に用いられる。この調製物は全細胞もしくは界面活性剤の添加または他の当該分野で周知の手法により差次的な遠心分離から得られる亜細胞画分を、可溶化して調製する。あるいは、シグナル配列を有する可溶性のCHEPOポリペプチドは細胞が培養された培地中に有用な量分泌され得る。

【0261】

可溶性のCHEPOポリペプチド含有調製物をイムノアフィニティーカラムを通過させて、カラムをCHEPOポリペプチドの優先的な吸光がみられる条件下（例えば、界面活性剤の存在下でイオン強度の高い緩衝液を用いる）で洗浄する。次いで、抗体/CHEPOポリペプチド結合を破壊するような条件下（例えば、約pH2~3のような低pH緩衝液、もしくは高濃度のカオトロピック塩（例えば、尿素もしくはチオシアネートイオン）を用いる）でカラムからの溶出を行い、CHEPOポリペプチドを収集する。

【0262】

（実施例9：薬物スクリーニング）

本発明は任意の種々の薬物スクリーニング技術においてCHEPOポリペプチ

ドもしくはその結合フラグメントを用いて化合物のスクリーニングを行う場合に特に有用である。このような試験に用いるCHEPOポリペプチドもしくはそのフラグメントは溶液中に遊離しているか、固体支持体に担持されているか、細胞表面に生じているか、または細胞内に存在しているかのいずれかであり得る。薬物スクリーニングの一つの手法は、CHEPOポリペプチドもしくはフラグメントを発現するための組み換え核酸で安定に形質転換されている真核生物もしくは原核生物宿主細胞を利用する。競合的な結合アッセイで形質転換した細胞に対する薬剤のスクリーニングを行う。生細胞であろうが固定化細胞であろうが、このような細胞を標準的な結合アッセイに用い得る。例えば、CHEPOポリペプチドもしくはフラグメントと試験薬剤との複合体の形成を測定し得る。あるいは、試験薬剤によって引き起こされるCHEPOポリペプチドと標的細胞もしくは標的レセプターとの複合体形成の減少を調べ得る。

【0263】

それ故に、本発明は、CHEPOポリペプチドの関連する疾患または障害に影響を及ぼし得る薬物または任意の薬剤のスクリーニング手法を提示するものである。これらの手法は、CHEPOポリペプチドもしくはそのフラグメントをこのような薬剤と接触させること、および(i)薬剤とCHEPOポリペプチドもしくはそのフラグメントの複合体の存在、もしくは(ii)CHEPOポリペプチドもしくはそのフラグメントと細胞の複合体の存在を当該分野で周知の手法を用いてアッセイすることを含む。このような競合的な結合アッセイにおいて、CHEPOポリペプチドもしくはそのフラグメントは、代表的には標識される。適切なインキュベーションの後、結合状態にあるCHEPOポリペプチドもしくはそのフラグメントを分離し、そして遊離もしくは非複合体の状態にある標識の量は、特定の薬剤がCHEPOポリペプチドへ結合する能力またはCHEPOポリペプチド/細胞複合体を妨害する能力の尺度である。

【0264】

別の薬物スクリーニング技術はポリペプチドに対して適切な結合親和性を有する化合物のハイスループットスクリーニング技術を提供し、詳細はW0 84 / 03564 (1984年9月13日公開)に示されている。簡単に述べると、

多数の異なる小サイズのペプチド試験用化合物をプラスチックピンもしくはいくつかの他の表面のような固体基板上で合成する技術である。CHEPOポリペプチドに適用する場合、このペプチド試験用化合物をCHEPOポリペプチドと反応させて、洗浄する。結合したCHEPOポリペプチドを当該分野で周知の手法により検出する。また、精製したCHEPOポリペプチドは前述の薬物スクリーニング技術に使用するプレート上に直接コーティングし得る。加えて、固体担体上でペプチドを捕捉し、固定化する場合に非中和状態の抗体を使用し得る。

【0265】

また、本発明はCHEPOポリペプチドと特異的に結合し得る中和抗体が、CHEPOポリペプチドもしくはそのフラグメントへの結合に関して試験化合物と競合する場合における競合的な薬物スクリーニングアッセイの利用を意図する。このように、抗体を、CHEPOポリペプチドに対して1つ以上の抗原性決定因子を共有する任意のペプチドの存在の検出にも利用し得る。

【0266】

(実施例10：合理的な薬物設計)

合理的な薬物設計の最終目的は、目的の生理活性ポリペプチド(すなわち、CHEPOポリペプチド)の構造的アナログもしくはそれと相互作用する低分子物質(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビター)を生成することである。これらの例は、いずれもCHEPOポリペプチドのより活性または安定性の高い形としての薬剤、もしくはCHEPOポリペプチドのインビボにおける機能(Hodgson, Bio/Technology, 9:19-21(1991)を参照のこと)を増強もしくは阻害する薬剤を作るために利用される。

【0267】

アプローチの一例は、CHEPOポリペプチド、もしくはCHEPOポリペプチド-インヒビター複合体の三次元構造をX線結晶解析、コンピューターモデリング、最も代表的には、この二種類の手法の組み合わせによって決定することである。分子の構造を解明し、活性部位を決定するためにはCHEPOポリペプチドの形態および電荷の両方を確かめなければならない。また、それほど必要ではないかもしれないが、相同なタンパク質の構造に基づいたモデル化を行うことで

CHEPOポリペプチドの構造に関する有用な情報を得ることもできる。どちらの場合でも適切な構造の情報はCHEPOポリペプチド様の分子アナログをデザインしたり、または効果的なインヒビターを同定するために利用する。合理的な薬物設計の有用な例としては活性や安定性を増加させた分子(BrextionおよびWells, Biochemistry, 31; 7796-7801 (1992)) またはネイティブなペプチドのインヒビター、アゴニスト、またはアンタゴニストとして機能する分子(Athaudaら、J. Biochem., 113; 742-746 (1993)) が挙げられる。

【0268】

上記のような機能解析を用いて選択された標的特異的な抗体を単離し、次いでその結晶構造を解明することも可能である。このようなアプローチによって、原則的には、引き続き行う薬物設計の基礎となるファーマコア(pharmacore) が得られる。機能的、薬理的に活性な抗体に対して抗イディオタイプ抗体(anti-id) を生成することによってタンパク質結晶学全体を考える必要がなくなることも可能である。鏡像体の鏡像として、anti-idの結合部位はもともとのレセプターアナログと考えられる。次いで、anti-idは化学的もしくは生物学的に生成したペプチドバンクよりペプチドを特定し、単離するために使うことができる。次いで、この単離したペプチドはファーマコアとして作用する。

【0269】

本発明によりX線結晶解析などの分析的な研究を行うに十分量のCHEPOペプチドの生成が可能である。さらに、本明細書中に記載したCHEPOペプチドのアミノ酸配列に関する知識はX線結晶解析に代わって、もしくは加えてコンピューターモデル化技術を採用する指針を提供し得る。

【0270】

上記の明細書は、当業者が本願発明を実施し得るに十分なものであると考えられる。本明細書中に示し、述べている事象に加えて、本発明の種々の改変は、上記の説明から当業者に明らかであり、またこれらは、本発明の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

図1A～Cは、ネイティブな配列のCHEPOをコードする、ヌクレオチド配列(ヌクレオチド134-146、667-812、1071-1157、1760-1839、および2074-2226、他を除く)を含む、単離されたゲノムDNA分子のヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。ゲノム配列において、開始コドン、エキソンおよびイントロンの位置、ならびに配列番号1のコード配列によってコードされるアミノ酸配列(配列番号2)も示される。

【図1B】

図1A～Cは、ネイティブな配列のCHEPOをコードする、ヌクレオチド配列(ヌクレオチド134-146、667-812、1071-1157、1760-1839、および2074-2226、他を除く)を含む、単離されたゲノムDNA分子のヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。ゲノム配列において、開始コドン、エキソンおよびイントロンの位置、ならびに配列番号1のコード配列によってコードされるアミノ酸配列(配列番号2)も示される。

【図1C】

図1A～Cは、ネイティブな配列のCHEPOをコードする、ヌクレオチド配列(ヌクレオチド134-146、667-812、1071-1157、1760-1839、および2074-2226、他を除く)を含む、単離されたゲノムDNA分子のヌクレオチド配列(配列番号1)を示す。ゲノム配列において、開始コドン、エキソンおよびイントロンの位置、ならびに配列番号1のコード配列によってコードされるアミノ酸配列(配列番号2)も示される。

【図2】

図2は、CHEPO分子のcDNA配列(配列番号3)およびそれによってコードされるアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図3】

図3は、ヒトエリスロポエチンアミノ酸配列(ヒト)(配列番号4)および本明細書中で記載したチンパンジーエリスロポエチン(chepo)の比較を示す。ここでCHEPO配列のアミノ酸位置142でXと示されるアミノ酸は、グルタミン(配列番号2)またはリシン(配列番号5)のいずれかである。

【 1 A 】

```

: CCCCCTGGAC AGCCGCCCTC TCCTCCAGGC CCGTGGGGGT GGCCTGCAC CCGGAGCTT CCGGGATGA GGGCCCCCGG TGTGGTCACC GGGGGGGCCC
GGGGGACCTG TCGGCGGGAG AGGAGGTCCG GGCACCCCGA CCGGACCTG GGGCTCGAA GGGCCCTACT CCGGSGGCC ACACCAAGTG GCCCGCGGG
: 10: CAGGTGCTG AGGACCCCG GCCAGGCCG GAGATGGGG TGCAAGGTGA GTACTGCGG GCTGGGGCT CCGGCCGCC CGGTCCTG TTTAGCGGG
GTCCAGGCAC TCCCTGGGC CCGTCCGGC CTCTACCCC AGTGCACCT CATEGGCC CGACCCCGA GGGCGGGCG GCCCAGGGAC AAACTCGGCC
:
M G V H
^I+/>1
~Met
20: GATTAGGC CCGGGTATT GGCCTGGAGG TGGCTGGGT CAAGGACCG GACTTGTCA AGGACCCCG AAGGGGAGG GGGTGGGC AGCTCCACG
CTAAATCCG GCGCCGATPA CCGGCCCTCC ACCGACCAA GTTCTGGC GCTGAAGAT TCTGGGGC TTCGCCCTC CCCCACCCG TCGGAGGTG
30: TGCCAGCGG GACTTGGGG AGTCTTGGG GATGGCAAA ACCTGACCTG TGAAGGGAC ACAGTTGGG GGTTCAGGG AAGAAGTTT GGGGTTCTG
ACGGTCGCC .CTGAACCCC TCAGGMAACC CTACCGTTT TGAAGTGGC ACTTCCCTG TGTCAAACC CCAACTCCC TTCTTCCAA CCCCAGAGC
40: CTGTCCAST GGAGAGGAG CTGATAAGT GATAACCTG GCGCTGGAG CACCATTAT CTGCCAGAG GNMNTGTA GCTGGGGTG GGGTGTGCAC
GACACGSA CCTCTCTTC GACTATTGA CTATTGGAC CCGACCTCG GTGGTAATA GACGTCTCC CNNNACCNT CGACCCCCAC CCCACAGTG
50: ACGGACGAG GATTGAATGA AGCCAGGGA GGCAGCACT GAGTCTTGC ATGTTGGG ACAGGAAGA CGAGCTGGG CAGAGAGTG GGGATGAAG
TGCCGTCTC CTAACTTACT TCCGGTCCCT CCGTCTGGA CTCACGAAC TACCAACCC TGTCTTCTT GCTCGACCC GTCTGTGCAC CCTTACTTC
60: AAGTGTCT TCCACAGCA CCTTCTCC CCCCCTGG ACTCTAGCC TGGTATCTC TTCTAGATG TCTTCCCTG CTGTGCTTC TCCTGCTCC
TTGGACAGGA AGGTGTGGT GGGAGAGGG AGGGCGGAC TGAGAGTGG ACCGATAGAG AAGTCTTAC AGGACGGACC GACCCGAG AGGACAGGA
:
E C P A W L W L L L S L
^I+/>2
70: GCTGTCTC CCTCTGGCC TCCAGTCT GGGCGCCCA CCACGCTCA TCTGTGACG CCGATCTG GAGAGTACC TCTTGGAGC CAAGGAGCC
CGACAGGAG GGAGACCCG AGGTCAGGA CCGCGGGGT GTGGGAGT AGACTGTG GGTCCAGGAC CTCTCCATGG AGAAGCTCG GTTCTCCCG
: 80: L S L P L G L P V L G A P P R L I C D S R V L E R Y L L E A X E A
GAGAATATCA CCGTGAACC CCTTCCCAG CACATTCCAC AGAAGTCCG CTCAGGCTT CAGGAACTC CTCACAGATC CAGGAACCTG GCACTTGGT
CTCTTATAGT GCCACTCTGG GGAAGGGGTG GTGTAAGTGT TCTTGAAGT GAGTCCCGAA GTCCCTTAG GAGGTCTAG GTCTTGGAC CCGTAACCA
46 E N I T

```

【 1 B 】

901 TGGGTGGAC TTGGGAGCT AGACACTGCC CCCCTACATA ACAATAAGTC TGTGTGCCCC AAACATACC TGGAACTAG GGNAGGACA AAGCCAGCAG
 ACCCCAGCTC AACCTTTGGA TCTGTGACGG GGGGATGTAI TCTTATTCAG ACCACGGGG TTGTGTATG ACCTTTGTATG CBTTCCTCCT TTGGGTCTGT

1001 ATCTTAGGC CTGTGGCCA GGGCCAGGC CTTCAGGAC CTTTACTCC CCGGGCTGTG TCAATTCAG AGGGTGTG CGBACACTG CAGCTTGAAT
 TAGGATCCG GACACCCGGT CCGGGTCTGG GAAATGCTG GAACTGAGG GGGCCGACAC ACCTAAGCTC TGGCCGACAC GBCTTGTGAC GTGGAACCTA
 T G C A E H C S L N
 -147>3

1

1101 GAGAAATCA ETGTCCAGA CACGAAAGT MATTCATG CTTGGAAG GATGAGGTG AGTTCCTTT TTTTTTTTT TCTTTCTTT TGGAGATCT
 CTCTTATGT GACAGGACT GTGGTTTCA TTAAAGATAC GBACTTCTC CTACTCTAC TCAAGGAAA AAAAAAAA AGGAAAGAAA ACCTCTTAGA
 I I E N I T V P D T K V N F Y A W K R M E

1201 CATTTCCGAG CTGTATTTG GATGABGG AGRATGATCG ABBGAAAGT AAAATGGAGC AGCAGATG AGGTGCTG GGGCCAGAGC CTCACGICTA
 GTAACGCTC GBACTAAAC CTACTTTCC TCTTACTAG TCCCTTCCA TTTTACTCG TCGTCTCTAC TCCGACGGAC CCGGTCTCC GAGTGCAGAT

1301 TAAATCCAG CTGAGATGC CGAGTGGG GAAATGCTG ACCCTGAG TTTCAGCA ACCTGGGAG CATAGTGA TCCCCATCT CTACAAACAT
 ATTAGGTCC GACTCTACC GCTCTACC CTTAAGCAAC TGGGACCTC AAGTGTGT TGAACCTG CTATCACTCT AGGGGTAGA GATTTTTGTA

1401 TAAATCCAG TAGTCAGGTG AGTGGTGA TGGTGTAGT CCGAGTAT TGGAAAGCTG AAGGGGAGG ATCGCTTGG CCGAGAAIT TGAGGTGCA
 AATTTTTTA ATCAGTCCAC TCCACCAGT ACCACCATCA GGTCTATTA ACCTTCCGAC TCCGCTCC TAGGAACTC GGTCTCTTAA ACTCCGAGCT

1501 GTGAGCTG ATCACCAC TCCACTCCAG CCTCAGTGC AGATGAGC CTGTCTCA AABAGAAG AAAAAGAAA AATAATGAG GCTGTATGGA
 CACTGGAC TACTGTGGT ACATGAGT GBACTCAGT TCTCACTCC GNCAGAT TTTCTTTT TTTTTCTTT TTATTACTCC CGACATACCT

1601 ATTCATTCA TATTCATCA CTCACTCA TTTCAATTA CATTCATTA TTTCAATTA TTTCAATTA TTTCAATTA TTTCAATTA TTTCAATTA TTTCAATTA
 TATGTAGTA ATAAATAGT GAGTGAATTA GATGATGTA GATGATGTA GATGATGTA GATGATGTA GATGATGTA GATGATGTA GATGATGTA GATGATGTA

1701 AGGGCAGGA GGGAGAGGT GGCATGGCTC AGCTGACTC CAGATGCC TCCCTGTAGG TCGAGGACA GGGGAGAAA CTGTGGGAG GCTTGGCTC
 TCCCGTCT CCGTCTCCA CCGTACCAG TCGACTGAG GTCTGAGTG AGGAGATCC AGTCCGCT CCGGATCTT CAGACCTCT CAGACCTCT CCGGAGCGGA
 V R Q Q A V E V W Q G L A L
 -147>4

1

1801 GCTCTGGAA GCTGTCTGC GGGCCAGGC CTTTGTGTC AACCTTCCC AGCTGTGGA GCGCTGAG CCGCTGAG ATAAAGCCT GAGTGGCTC
 CGAGAGCTT GACAGGACG CCGCGTCCG GBAACACAG TTGAGAGGG TGGGACCT GGGGAGCTC GAGTACAC TATTGGCA GTACGCGAA

1901 CCGAGCTCA CCACTCTGT TGGGCTCTG GBAACACAG TGGATGAG CCGACTTC TCGTGGCT TCGTGGCT TCGTGGCT TCGTGGCT TCGTGGCT
 GCTGGAGT GGTGAGAGA AGCCCGAG CCGGGGTC ACTCATCTC GCTGTGAG AGAAGCGGA AAGACATCT TCCCTTTTC CCGAAGCAT

40 R S L T T L L R A L G A Q
 L S E A V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L H V D K A V S G L

2001 AGGAGTACAG GAACTGTCCG TATTCCCTCC CCTTCGTGG CACTGCAGCG ACCTCCTGTT TTCTCCTTGG CAGAGGGAAG CCATCTCCCC TCCAGATCCG
 TCCTCATGTC CTTGACAGGC ATAGGGAAGG GGAAGACACC GTGACGTCCG TGGAGACAA AAGAGGAACC GCTCTCCTTC GGTAGAGGGG AGGTCTAGGC

K E A I S P P D A
 ^141/5

1

2101 GCCTCAGCTG CTCRCCTCCG AACATCACT GCTGACACTT TCCGAACT CTCCGAGTC TACTCCAATT TCCTCCGGGG AAAGCTGAAG CTGTACACAG
 CCGAGTCGAC GAGGTGAGGC TTGTTAGTGA CGACTGTGAA AGGCCTTGA GAAGGCTCAG ATGAGGTTAA AGGAGGCCCC TTTCGACTTC GACATGTGTC

10 A S A A P L R T I T A D T F R K L F R V Y S N F L R G K L K L Y T G

2201 GGGAGGCTG CAGGACAGGG GACAGATGAC CAGGTGTGTC CACTGGGCA TAICCCACC CACCCTCACC AACATTGCTT GTGCCACACC CTCCTCCGCG
 CCTCCGGAC GTCTGTCCC CTGTCTACTG GTCCACACAG GTGGACCCCT ATAGGTGCTG GAGGACTGG TTGTAACGAA CAGGCTGTGG GAGGGGGGG

44 E A C R T G D R O

2301 ACTCCTGAAC CCGTCCAGG AGCTCTCAG
 TGAGGACTTG GGGCACTCC TCGAGAGTC

【 2 】

1 ATGGGGTGC ACGRATGTCC TGCCTGCTG TGGCTTCTCC TGTCCTCTGCT GTCCGTCCCT CTGGGCTCC CAGTCCTGGG CGCCCCACCA CGCCTCATCT
TACCCCCACG TGCTTACAGG ACGGACCGAC ACCGAAAGG ACAGGACGA CAGCGAGGA GACCCGAGG GTCAGACCC GCGGGGTGGT GCGGAGTAGA
1 M G V H E C P A W L W L L L S L L S L P L G L P V L G A P P R L I C
101 GTGACAGCCG AGTCCIGGAG AGGTACCTCT TGQAGGCCAA GAGGCCGAG ANTATCAGCA CGGCTGTGC CGAACACTGC AGCTTGAATG AGAATATCAC
CACTGTCCGC TCAGGACCTC TCCATGGAGA ACCTCCGGTT CCTCCGCTC TTATAGTCT GCCCGACAG GCTTGTGACG TCGAACCTTAC TCTTATAGTG
35 D S R V L E R Y L L E A K E A E N I T T G C C A E H C S L N E N I T
201 TGTCCAGAC ACCAAAGTTA ATTTCTATGC CTGGAAGAGG ATGGAGTCA GGCAGCAGGC CGTAGAGTC TGGCAGGGCC TGCCCTGCT CTGCGAAGCT
ACAGGCTCTG TGGTTTCAAT TAAGATACG GACCTTCTCC TAGCTCCAGT CCGTCCGCG GCATCTTCAG ACCGTCCCG ACCGGAGCA GAGCCTTCGA
68 V P D T K V N F Y A W K R M E V R Q Q A V E V W Q G L A L L S E A
301 GTCTGCGGG GCCAGGCCCT GTTGTCAAC TCTTCCAGC CGTGGAGCC CCTGCAGTC CATGTGATA AAGCCGTCAG TGGCCTTCC AGCCTCACCA
CAGGACCCC CGTCCGGGA CAACCACTG AGAAGGTTCG GCACCCTCG GCACCTTAT TCGGCACTT TCGGCACTC ACCGGAAGCG TCGGAGTGGT
101 V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L H V D K A V S G L R S L T T
401 CTCTGCTTCG GGCTCTGGGA GCCCAGAGG AAGCCATCTC CCCTCCAGAT CGGGCTCAG CTGCTCCACT CCGAACATC ACTGTGACA CTTTCCGCA
GAGACGAGC CCGAGACCCCT CGGGTCTTC TTCGGTAGAG GGGAGTCTA CGCCGAGTC GACGAGTGA GGCTTGTTRG TGACGACTGT GAAAGCGGTT
135 L L R A L G A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I T A D T F R K
^ (RL 1607 Kおけり型 (A3本(3C). Aは、9>10ノ複製配列を長ク変化マエ。)
501 ACTCTTCCGA GTCTACTCCA ATTTCCCTCC GGAAGCTG AAGTGTACA CAGGGAGGC CTGCAGGACA GGGACAGAT GACCA
TGAGAGGCT CAGATGAGGT TAAAGGAGC CCCTTAGAC TTGAGATGT GTCCCTCCG GACSTCCTGT CCCCTCTA CTGGT
168 L F R V Y S N F L R G K L K L Y T G E A C R T G D R O

【図3】

t	MGVHECPAWLWLLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAE *****
chepo	MGVHECPAWLWLLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAE
t	NITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEA *****
chepo	NITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVRQQAVEVWQGLALLSEA
t	VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGAXKEAISPPD *****
chepo	VLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRRLGAXKEAISPPD
t	AASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACRTGDR *****
chepo	AASAAPLRTITADTFRKLFVYSNFLRGKLYTGEACRTGDR

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						Int'l Application No PCT/US 00/12370
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER						
IPC 7	C12N15/11	C12N15/12	C12N15/62	C07K14/505	C07K16/22	
	G01N33/50	G01N33/53	A61K48/00	A61K38/18	A61P7/06	
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 A61P						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)						
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, STRAND, EMBL						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages					Relevant to claim No.
X	WO 94 24160 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 27 October 1994 (1994-10-27) Note: 89.9 (89.4) % aa seq identity of monkey EPO with SEQ ID NO:2 (5) in 189 aa overlap, 86.9 % nt seq identity of cat EPO cDNA with SEQ ID NO:3 in 573 aa overlap. the whole document page 7, line 8 -page 8, line 12 example 1 page 55, table IV figure 6 --- -/--					1,8-15, 20,21
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.					<input checked="" type="checkbox"/>
* 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		
30 August 2000				15/09/2000		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016				Authorized officer van de Kamp, M		

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/12370

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WEN D ET AL.: "Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals" BLOOD, vol. 82, no. 5, 1 September 1993 (1993-09-01), pages 1507-1516, XP000938929 Note: 90.2 (89.6) % aa seq identity of Macaca mulatta EPO with SEQ ID NO:2 (5) in 193 aa overlap. the whole document</p>	1,8,20,21
X	<p>WO 95 05465 A (AMGEN INC) 23 February 1995 (1995-02-23) Note: 100 % aa seq identity of Asn57Thr59 EPO with SEQ ID NO:32. page 5, line 10-25 page 41, table 3, analog N9 page 56, table 6, Asn57Thr59 claims 1-8,10</p>	1,8-15,20,21,34-38
X	<p>EP 0 410 246 A (BEHRINGWERKE AG) 30 January 1991 (1991-01-30) the whole document</p>	28-33
X	<p>WO 95 13376 A (AMGEN INC ;UNIV SOUTHERN CALIFORNIA (US)) 18 May 1995 (1995-05-18) Note: 99.5 % aa seq identity of human EPO with SEQ ID NO:2 in 193 aa overlap, 99.5 % nt seq identity of human EPO cDNA with SEQ ID NO:3 in 585 nt overlap. page 38-40</p>	1,8-15,20,21
X	<p>WO 85 02610 A (KIRIN AMGEN INC) 20 June 1985 (1985-06-20) Note: 91.2 (90.7) % aa seq identity of Cynomolgus monkey EPO with SEQ ID NO:2 (5) in 193 aa overlap. examples 3,10,12</p>	1,8-15,20,21
A	<p>WO 99 02709 A (STROM TERRY B ;ZHENG XIN XIAO (US); BETH ISRAEL HOSPITAL (US); SYT) 21 January 1999 (1999-01-21) page 22, line 24 -page 29, line 7</p>	22,24,36,38
P,X	<p>WO 00 24893 A (AMGEN INC) 4 May 2000 (2000-05-04) Note: 100 % aa seq identity of Asn55Thr57 EPO with SEQ ID NO:24. page 7, line 2-10 page 27, table 1, analog N54 claims 9,11,23-27</p>	1,8-15,20,21,34-38

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 28, 30(b), 31(b)

Remark (2): Present claims 28-32 relate to an extremely large number of possible CHEPO agonists and antagonists. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the antagonists claimed. 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. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to anti-CHEPO antibodies, as claimed in claims 30 and 33. Claim 28, and those parts of claims 30 and 31 where reference is made to agonists to a CHEPO polypeptide, have not been searched.

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 00/12370

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9424160 A	27-10-1994	AU 6709794 A	08-11-1994
WO 9505465 A	23-02-1995	AT 155796 T	15-08-1997
		AU 677097 B	10-04-1997
		AU 7632794 A	14-03-1995
		CN 1105030 A	12-07-1995
		CZ 9500917 A	13-03-1996
		DE 69404401 D	04-09-1997
		DE 69404401 T	19-02-1998
		DK 640619 T	02-02-1998
		EP 0640619 A	01-03-1995
		ES 2105442 T	16-10-1997
		FI 951792 A	18-05-1995
		GR 3024815 T	30-01-1998
		HK 1001589 A	26-06-1998
		HU 72849 A	28-05-1996
		JP 11155584 A	15-06-1999
		JP 2938572 B	23-08-1999
		JP 8506023 T	02-07-1996
		LV 10972 A	20-12-1995
		LV 10972 B	20-10-1996
		NO 951445 A	16-06-1995
		NZ 273134 A	24-11-1997
		SI 640619 T	28-02-1998
		SK 50295 A	09-08-1995
		ZA 9406122 A	20-03-1995
EP 0410246 A	30-01-1991	DE 3924746 A	31-01-1991
		AT 161577 T	15-01-1998
		AU 648506 B	28-04-1994
		AU 5977890 A	31-01-1991
		CA 2021912 A	27-01-1991
		DE 59010787 D	05-02-1998
		ES 2111524 T	16-03-1998
		GR 3026096 T	29-05-1998
		JP 3081294 A	05-04-1991
		KR 175657 B	01-04-1999
		PT 94813 A, B	20-03-1991
		US 5712370 A	27-01-1998
		US 5106954 A	21-04-1992
WO 9513376 A	18-05-1995	AU 1095595 A	29-05-1995
		CA 2183551 A	18-05-1995
		EP 0737252 A	16-10-1996
WO 8502610 A	20-06-1985	US 4703008 A	27-10-1987
		AT 54940 T	15-08-1990
		AU 1007495 A	06-04-1995
		AU 657555 B	16-03-1995
		AU 2042192 A	08-10-1992
		AU 3612597 A	18-12-1997
		AU 600650 B	23-08-1990
		AU 3746785 A	26-06-1985
		AU 5272293 A	24-03-1994
		AU 5750490 A	04-10-1990
		AU 6981798 A	20-08-1998
		CA 1339047 A	27-05-1997
		CY 1643 A	14-05-1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No

PCT/US 00/12370

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8502610 A		DE 3482828 D	30-08-1990
		DK 365185 A	11-10-1985
		EP 0148605 A	17-07-1985
		ES 538519 D	01-05-1988
		ES 8802329 A	16-07-1988
		HK 20093 A	19-03-1993
		IL 73785 A	15-11-1992
		IL 96581 A	13-05-1993
		IL 96582 A	04-04-1993
		IL 100935 A	04-04-1993
		JP 2708099 B	04-02-1998
		JP 8269096 A	15-10-1996
		JP 6093000 A	05-04-1994
		JP 7076239 B	16-08-1995
		JP 2957974 B	06-10-1999
		JP 10095799 A	14-04-1998
		JP 3017962 B	13-03-2000
		JP 10072366 A	17-03-1998
		JP 1055190 A	02-03-1989
		JP 2107224 C	06-11-1996
		JP 6055136 B	27-07-1994
		JP 1975769 C	27-09-1995
		JP 3198792 A	29-08-1991
		JP 4035159 B	10-06-1992
		JP 2655750 B	24-09-1997
		JP 3259098 A	19-11-1991
		JP 11253188 A	21-09-1999
		JP 2017156 B	19-04-1990
		JP 61501627 T	07-08-1986
		MX 9203598 A	01-09-1992
		NZ 210501 A	27-08-1991
		NZ 227326 A	27-08-1991
		NZ 227327 A	27-08-1991
	SG 92891 G	14-02-1992	
	US 5955422 A	21-09-1999	
	US 5441868 A	15-08-1995	
	US 5756349 A	26-05-1998	
WO 9902709 A	21-01-1999	AU 8182298 A	08-02-1999
WO 0024893 A	04-05-2000	AU 1124100 A	15-05-2000

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)	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10		21/08	
C 1 2 P	21/02	C 1 2 R	1:19	
// C 1 2 P	21/08		1:91	
(C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 R	1:19)		5/00	B
(C 1 2 N	5/10			
C 1 2 R	1:91)			

(31)優先権主張番号 09 / 552 , 265

(32)優先日 平成12年4月19日(2000.4.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, 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, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, 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 デサウベジ, フレドリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404,
フォースター シティ, シューティン
グスター アイル 187

(72)発明者 ヘンナー, デニス ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044,
パシフィカ, アンジェリタ アベニュー
- 297

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA43 CA04
CA07 CA11 DA02 DA06 DA12
EA02 EA03 EA04 FA02 GA03
GA11 HA01 HA03
4B064 AG02 AG27 CA02 CA06 CA10
CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA72X AA90Y AA91X
AB01 AB04 BA01 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA13 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	新型黑猩猩促红细胞生成素 (CHEPO) 多肽和编码它们的核酸		
公开(公告)号	JP2002543784A	公开(公告)日	2002-12-24
申请号	JP2000616342	申请日	2000-05-05
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	デサウベイズフレドリック ヘンナーデニスジェイ		
发明人	デサウベイズ, フレドリック ヘンナー, デニス ジェイ.		
IPC分类号	C12N15/11 A61K A61K38/00 A61K38/18 A61K48/00 A61P A61P7/06 C07K C07K14/505 C07K16/22 C07K19/00 C12N C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/62 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/19 C12R1/91 G01N G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 C07K14/505 C07K2319/00		
FI分类号	C07K14/505 C07K16/22 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12R1/19 C12R1 /91 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024 /DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B064/AG02 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064 /CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065 /CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA13 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045 /FA74		
优先权	09/307307 1999-05-07 US 60/287594 2000-03-28 US 09/552265 2000-04-19 US		
其他公开文献	JP3660880B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及分离的新的黑猩猩促红细胞生成素 (CHEPO) 多肽和编码这些CHEPO多肽的分离的核酸分子。包含这些分离的核酸序列的载体和宿主细胞, 包含与异源蛋白质融合的本发明的CHEPO多肽的嵌合分子, 结合本发明的CHEPO多肽的抗体和本发明的CHEPO多肽。还提供了一种生成方法。