

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 506088

(P2003 - 506088A)

(43)公表日 平成15年2月18日 (2003.2.18)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-コード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 6 3
38/00			N 4 B 0 6 4
39/395		45/00	4 B 0 6 5
		48/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全173数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 515835(P2001 - 515835)

(86)(22)出願日 平成12年8月3日(2000.8.3)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月4日(2002.2.4)

(86)国際出願番号 PCT/US00/21284

(87)国際公開番号 W001/011050

(87)国際公開日 平成13年2月15日(2001.2.15)

(31)優先権主張番号 60/147,294

(32)優先日 平成11年8月4日(1999.8.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アムジェン インコーポレーテッド
SYNERGEN INCORPORATED
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91320 - 1799, サウザント オークス, ワン アムジェン センター ドライブ

(72)発明者 スー, ハイリン
アメリカ合衆国 カリフォルニア, ムーアパーク, ブルーサムウッド 11623

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 TNFリガンドスーパー遺伝子ファミリーの新規のメンバーであるFhm

(57)【要約】

本発明は、TNF遺伝子スーパーファミリーに属するFhmと称される新規のポリペプチドをコードする、精製されたポリヌクレオチド；精製されたFhmポリペプチド分子；Fhmを結合する抗体；このような分子を含む物質；およびこのような分子を使用する方法を提供する。本発明の単離された核酸分子は、例えば、(a)配列番号3に示すヌクレオチド配列；(b)配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c)中程度または高度にストリンジェントな条件下で(a)または(b)の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドは、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および(d)(a)~(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

	B	C	コンセンサス
139*	...+PAMHIT...P...	...LW...LW...	コンセンサス
137*	EKKELKAVVAVLTKCKN	SSS-MPLREDTYCH	ヒト FasL
136*	EKKCPKSVVAVLTKCPK	SSS-IPLEMDPTGK	マウス FasL
135*	ETKPKPSVAVLTKNPK	SSS-IPLEMDITGK	ラット FasL
115*	GEHPFLAAHVLSAAS	KTL-SYIQMAKQVY	ヒト CD40L
117*	GEHPFLAAHVLSAAS	MAA-SYIQMAKQVY	マウス CD40L
119*	GEHPGPFAMLTINAAIF	SSSHVYIASSWTHDKCN	マウス OEG1
116*	SELRGAPFAMLTINATDIP	SSSHVYIASSWTHDKCN	ヒト OEG1
120*	GEHPGVAAHITITRENSKALIF	SSSREKAKGKINSSESCHG	ヒト TRAIL
121*	GEHPGVAAHITITRENSKALIF	SSSREKAKGKINSSESCHG	マウス TRAIL
122*	GEHPGVAAHITITRENSKALIF	LAK-TLQSWKQK	ヒト CD136
97*	SPFSEKSNVAVVAVK	LAK-TLQSWKQK	ヒト CD136
98*	DSSKGRVAVVAVK	LAK-TLQSWKQK	マウス CD136
102*	SSSREKAKGKINSSESCHG	SSSREKAKGKINSSESCHG	ヒト LY10
103*	SSSREKAKGKINSSESCHG	SSSREKAKGKINSSESCHG	マウス LY10
57*	TEGILKAAKALVYK	SSS-ALGKAVYK	ヒト TNFβ
58*	TEGILKAAKALVYK	SSS-ALGKAVYK	マウス TNFβ
85*	QNSDQKPVAVVAVK	SSS-GLKLRARAK	ヒト TNFα
89*	FAKSDKPVAVVAVK	SSS-GLKLRARAK	マウス TNFα

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号3に示すヌクレオチド配列；

(b) 配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

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

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

【請求項2】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号4に示すポリペプチドに少なくとも約70パーセント同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号3に示すヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライズ改変体をコードするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

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

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で(a)～(d)の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および

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

【請求項3】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号4に示すポリペ

プチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮化および/またはN末端短縮化を有する配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

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

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で(a)~(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および

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

【請求項4】 請求項1、2または3に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】 真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】 原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】 Fhmポリペプチドを産生するためのプロセスであって、請求項5に記載の宿主細胞を、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で培養する工程、および必要に応じて、該ポリペプチドを該培養物から単離する工程

を包含する、プロセス。

【請求項9】 請求項8に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。

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

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

【請求項12】 Fhmポリペプチド活性またはFhmポリペプチド産生の候補インヒビターを同定するためのプロセスであって、請求項5、6または7に記載の細胞を、該候補インヒビターに曝露する工程、および該細胞中でのFhmポリペプチド活性またはFhmポリペプチド産生を測定する工程、該候補インヒビターに曝露された細胞におけるFhmの活性を、該候補インヒビターに曝露されていない細胞における活性と比較する工程を包含する、プロセス。

【請求項13】 Fhmポリペプチド活性またはFhmポリペプチド産生の候補刺激因子を同定するためのプロセスであって、請求項5、6または7に記載の細胞を該候補刺激因子に曝露する工程、および該細胞におけるFhmポリペプチド活性またはFhmポリペプチド産生を測定する工程、該候補刺激因子に曝露された細胞におけるFhmの活性を、該候補刺激因子に曝露されていない細胞における活性と比較する工程を包含する、プロセス。

【請求項14】 配列番号4に示すアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項15】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号4に示す成熟アミノ酸配列であって、残基1で成熟アミノ末端を含み、必要に応じてさらに、アミノ末端メチオニンを含む、成熟アミノ酸配列；

(b) 配列番号4のオルソログについてのアミノ酸配列であって、該コードさ

れるポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも約70パーセント同一であるアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

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

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

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項16】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号4に示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号4に示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号4に示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

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

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮化およびN末端短縮化からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号4に示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチ

ドの活性を有する、アミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項17】 配列番号4の151位のアミノ酸が、セリン、トレオニン、アラニンおよびシステインからなる群より選択される、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項18】 配列番号4の153位のアミノ酸が、バリン、イソロイシン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニンおよびノルロイシンからなる群より選択される、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項19】 配列番号4の145位のアミノ酸が、プロリン、アラニンおよびグリシンからなる群より選択される、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項20】 配列番号4の146位のアミノ酸が、グルタミン酸またはアスパラギン酸からなる群より選択される、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項21】 配列番号4の147位のアミノ酸が、トリプトファン、フェニルアラニン、トレオニン、セリンおよびチロシンからなる群より選択される、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項22】 配列番号4の154位のアミノ酸が、ロイシン、バリン、イソロイシン、アラニンおよびチロシンからなる群より選択される、請求項15または16に記載のポリペプチド。

【請求項23】 請求項1、2または3の核酸分子によってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項24】 前記パーセント同一性が、GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFitおよびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータプログラムを用いて決定される、請求項15に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項25】 配列番号4のアミノ酸配列を含むペプチドで動物を免疫することによって産生される、抗体。

【請求項26】 請求項14、15または16に記載のポリペプチドを特異的に結合する、抗体またはそのフラグメント。

【請求項27】 モノクローナル抗体である、請求項26に記載の抗体。

【請求項28】 配列番号4のアミノ酸配列を含むペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項29】 サンプル中のFhmの量を検出または定量する方法であって、Fhmポリペプチドを含むと疑われるサンプルを、請求項25、26または27に記載の抗Fhm抗体またはフラグメントと接触させる工程、および該抗体またはフラグメントの結合を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項30】 少なくとも1つのポリペプチドを特異的に結合する選択的結合因子またはそのフラグメントであって、該ポリペプチドが、以下：

(a) 配列番号4に示すアミノ酸配列；

(b) 配列番号4の少なくとも1つに示すアミノ酸配列のフラグメント；ならびに

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

【請求項31】 抗体またはそのフラグメントである、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項32】 ヒト化抗体である、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項33】 ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項34】 ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項35】 モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項36】 キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項37】 CDRグラフト化抗体またはそのフラグメントである、請

求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項38】 抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項39】 可変領域フラグメントである、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項40】 FabまたはFab'フラグメントである、請求項30に記載の可変領域フラグメント。

【請求項41】 選択的結合因子またはそのフラグメントであって、配列番号4のアミノ酸配列を有するポリペプチドについての特異性を有する少なくとも1つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項42】 検出可能な標識に結合している、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項43】 Fhmポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項30に記載の選択的結合因子。

【請求項44】 疾患、状態または障害を処置、予防または改善するための方法であって、患者に、請求項30に記載の有効量の選択的結合因子を投与する工程を包含する、方法。

【請求項45】 動物を、配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドで免疫することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項46】 請求項14、15または16に記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項47】 請求項14、15または16に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項48】 前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定剤または抗酸化剤である、請求項47に記載の組成物。

【請求項49】 前記ポリペプチドが、配列番号4に示す成熟アミノ酸配列を含む、請求項47に記載の組成物。

【請求項50】 請求項14、15または16に記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項51】 水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変されている、請求項50に記載のポリペプチド。

【請求項52】 前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリビニルアルコールからなる群より選択される、請求項51に記載のポリペプチド。

【請求項53】 請求項1、2または3に記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項54】 前記核酸分子が、ウイルスベクターに含まれる、請求項53に記載の組成物。

【請求項55】 請求項1、2または3に記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項56】 異種のアミノ酸配列に融合された請求項14、15または16に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項57】 前記異種のアミノ酸配列が、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項56に記載の融合ポリペプチド。

【請求項58】 哺乳動物における、減少したレベルのFhmポリペプチドによって生じる医学的状態を処置、予防または改善するための方法であって、患者に、請求項14、15もしくは16に記載のポリペプチドを、または請求項1、2もしくは3に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法

【請求項59】 被験体における、異常なレベルのFhmポリペプチドによって引き起こされるかまたは異常なレベルのFhmポリペプチドから生じる病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 請求項14、15もしくは16に記載のポリペプチドまたは請求項1、2または3に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現の、サンプル中での存在または量を決定する工程；および

(b) 正常被験体またはより早い時期の該被験体由来の生物学的サンプル、組織サンプルまたは細胞サンプル中のF h mポリペプチドのレベルを比較する工程であって、病理学的状態に対する感受性が、該ポリペプチドの発現の存在または量に基づく、工程、を包含する、方法。

【請求項60】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適切な膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞

を備え、該細胞が、請求項14、15または16に記載のポリペプチドを分泌し、そして該膜が、タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に対して有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項61】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適切な膜；および

(b) 該膜内にカプセル化されたF h mポリペプチド

を備え、該膜が、該ポリペプチドに対して透過性である、デバイス。

【請求項62】 ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項14、15または16に記載のポリペプチドを化合物と接触させる工程；および

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

【請求項63】 動物におけるポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項1、2または3に記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項64】 請求項1、2または3に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項65】 診断試薬であって、配列番号4に示すアミノ酸配列、またはその対立遺伝子改変体およびスプライス改変体を含めて、そのフラグメント、改変体もしくはホモログをコードする、検出可能に標識されたポリヌクレオチド

を含む、診断試薬。

【請求項66】 前記標識されたポリヌクレオチドが、第1鎖cDNAである、請求項65に記載の診断試薬。

【請求項67】 生物学的サンプル中のFhm核酸の存在を決定するための方法であって、以下の工程：

(a) Fhm核酸を含む疑いのある生物学的サンプルを提供する工程；

(b) 該生物学的サンプルを、請求項60に記載の診断試薬と、該診断試薬が該生物学的サンプル中に含まれる該Fhm核酸にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；

(c) 該生物学的サンプルにおけるFhm核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションを検出する工程；および

(d) 該生物学的サンプルと診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルを、既知濃度のFhm核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルと比較する工程、
を包含する、方法。

【請求項68】 組織サンプルまたは細胞サンプルにおけるFhm核酸の存在を検出するための方法であって、以下の工程：

(a) Fhm核酸を含む疑いのある組織サンプルまたは細胞サンプルを提供する工程；

(b) 該組織サンプルまたは細胞サンプルを、請求項60に記載の診断試薬と、該診断試薬が該Fhm核酸とハイブリダイズする条件下で接触させる工程；

(c) 該組織サンプルまたは細胞サンプルにおけるFhm核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションを検出する工程；および

(d) 該組織サンプルまたは細胞サンプルと診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルを、既知濃度のFhm核酸と該診断試薬との間のハイブリダイゼーションのレベルと比較する工程、
を包含する、方法。

【請求項69】 前記ポリヌクレオチド分子が、DNAである、請求項67または68に記載の方法。

【請求項70】 前記ポリヌクレオチド分子が、RNAである、請求項67または68に記載の方法。

【請求項71】 Fhmポリペプチド活性のアンタゴニストであって、Fhmポリペプチドについての特異性を有する、Fhm選択的結合因子、低分子、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびペプチドまたはそれらの誘導体からなる群より選択される、Fhmポリペプチド活性のアンタゴニスト。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願)

本出願は、米国特許法第119条の下、1999年8月4日に出願された米国仮特許出願第60/147,294号による優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、組換え遺伝学の分野にある。特に、本発明は、Fhmと命名された、TNFリガンドスーパー遺伝子ファミリーに属する新規のレセプターリガンドおよびそれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、ベクター、宿主細胞、抗Fhm抗体、およびFhmポリペプチドを産生する組換え方法に関する。本発明はまた、推定上の結合パートナー/レセプターを同定するための、組換えFhmポリペプチドの使用に関する。さらに、異常なFhmもしくはその推定レセプターの異常な発現と関連する疾患の診断のための方法および試薬、ならびに異常なFhmまたはFhmおよび/もしくはそのレセプターの異常な発現と関連する疾患の処置のための方法および薬学的組成物が提供される。本発明はまた、これらの疾患の処置における使用のための薬学的組成物を開示する。

【0003】

(発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現および操作における技術の進歩は、ヒトゲノムの解読に基づいた新規の治療の発見を大いに加速した。急速な核酸配列決定技術は、現在、空前の速度で配列情報を生じ得、そしてコンピューターを使用した分析と結び付いて、ゲノム全体への重複配列の組立ておよびポリペプチドコード領域の同定を可能にする。公知のアミノ酸配列のデータベースコンパイルに対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の顕著な特徴に対する相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。改変体およびその誘導体を産生するための、核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療薬剤として使用するた

めの産物に対して有利な特性を与え得る。

【0004】

しかし、過去10年にわたるゲノム研究におけるかなりの技術進歩にかかわらず、ヒトゲノムに基づく新規の治療薬剤の開発能力は、まだ大部分実現されていない。潜在的に有益なタンパク質治療薬剤をコードする多数の遺伝子、または治療分子について「標的」として作用し得るポリペプチドをコードする遺伝子が、組換えDNA技術を使用して同定されたが、哺乳動物のゲノムにおける多数の遺伝子の構造および機能は、まだ未知である。

【0005】

(リガンドおよびレセプターのTNFファミリーの同定および特徴付け)

腫瘍壊死因子(TNF)は、カルメットگران桿菌(BCG)を感染させ、そして内毒素を注射したマウスおよびウサギの血清において最初に同定された。これらの動物の血清におけるTNF活性は、その細胞傷害性活性および抗腫瘍活性に基づいて認識された。TNFといわれるこのTNF活性は、特に、活性化された単球およびマクロファージにより産生され、そして正常な増殖プロセスならびに種々の疾患に関係している。

【0006】

TNF- α の発見後、独立した研究によって、炎症性応答リンホトキシン-LT- α と関連する別のサイトカインが同定され、LT- α は、リンパ球により独占的に産生されることが示された。LT- α は次に、TNF- α と30%相同であることが示され、そしてTNF- β と改名された。TNF- α およびTNF- β は、LT- α と名付けられるさらに別のメンバーを含む遺伝子ファミリーのメンバーである(Browningら、Cell 72:847-856, 1993)。この3つの遺伝子は、MHC複合体内にしっかりと連結しており、そして類似の構成を示す。さらに、生物学的に活性な形態のTNF- α およびTNF- β は、ホモトリマーであり、そして同じ細胞表面レセプターに対して競合することを含む、同じ生物学的活性のうちの多くを共有する(Agarwalら、Nature 318:665-667, 1985)。2つの異なるが、構造的に相同なレセプターが同定され、そして各々が、両方のリガンドを結合し、そ

してそれらの効果を媒介することが示されている。

【0007】

しかし、TNFが、急速に拡大するスーパー遺伝子ファミリーの代表的なメンバーにすぎないことが認識されている。スーパー遺伝子ファミリーとしては、TNF- α 、TNF- β /リンホトキシン- α (LT- α)、リンホトキシン- β (LT- β)、FasL、CD40L、CD30L、CD27L、4-1BBL、およびTNF関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL)、RANKL、GITRLおよびTNF-2が挙げられる。一般に、Orlinickら、Cell Signal, 10(8):543-551(1998)を参照のこと。TNFファミリーのメンバーのリガンドと、それらの同族の細胞表面レセプターとの相互作用の後、それらのリガンドにより誘導される、特有であるが、重複する細胞性応答は、リンパ系統、造血系統、および他の系統の細胞における明らかに規定される発生変化および調節変化を生じる。例えば、リガンドのTNFファミリーは、炎症、免疫プロセスおよび造血に関わる細胞の増殖調節および分化に関与する (Bayert, R. および Fires, W., Tumor Necrosis Factor and Lymphokines in: Cytokines、編、Anthony Mire-Sluis および Robin Thorpe, Academic Press San Diego CA, 1998)。TNFファミリーのリガンドは、寄生生物に対する免疫防御を活性化し、そして免疫反応および炎症プロセスにおける伝達物質として直接または間接に作用する。しかし、TNFおよび/またはTNFファミリーの他のメンバーの投与には、ショックおよび組織損傷のような有害な現象が付随し得る (Bayert, R. および Fiers, W., 前出)。TNFファミリーのリガンドの主要な生理学的役割は、微生物の感染、寄生生物の感染、ウイルス感染または機械的なストレスおよび癌に対する生物の第1線の反応である。例えば、TNF関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) は、多数の異なる型の癌細胞ならびにウイルスに感染された細胞のアポトーシスを誘導することが示された。

【0008】

さらに、多数の観察によってまた、TNFファミリーのリガンドもまた、種々

の病理学的状態（悪液質、トキシックショック症候群、リウマチおよび変形性関節症のような炎症性疾患を含む）、ならびに対宿主性移植片反応（GVHR）の急速な腫瘍壊死、アポトーシス、免疫刺激および寄生生物およびウイルスに対する耐性から生じる致死に関するとの結論に到達した（Bayer t , R . および F i e r s , W . , 前出）。

【0009】

他のサイトカインのように、リガンドのTNFファミリーのメンバーは、特異的細胞表面レセプターを介して作用する。例外が2つあるが、これらのレセプターは、1型膜結合タンパク質である。それらの間の配列相同性は、細胞外ドメインにほとんど完全に制限される。例えば、大きさおよび結合親和性において異なる2つのTNFレセプターがクローン化されている（Bayer t , R . および F i e r s , W . , 前出）。レセプターは両方とも、TNF - およびTNF - を結合し、そして膜結合タンパク質である。この2つのレセプターは、TNFを結合する（そして28%相同である）細胞外ドメイン、1つの膜貫通ドメイン、およびお互いに完全に異なり、そして任意の特定の機能と関連している任意の認識可能な構造モチーフを含まない細胞内ドメインからなる。それらの細胞外ドメインにおける類似性に基づいて、これらのレセプターは、低親和性神経増殖因子（NGF）レセプター、Fas抗原、ヒトBリンパ球活性化分子CD40、CD27、4-1BB、PV-T2、CD30、TNFR-RP、TRAIL-R、PV-A53R、RANK、GITR、および活性化T細胞に見出されるOX4抗原を含む、レセプター遺伝子スーパーファミリーに属する（Smithら, Cell , 76(6) : 959 - 962 , 1994 ; BakerおよびReddy , Oncogene , 12(1) : 1 - 9 , 1996）。

【0010】

上記の膜関連レセプター分子に加え、TNFレセプタースーパーファミリーに属する多数のレセプターは、可溶性リガンド結合タンパク質として存在する。膜貫通レセプターの多くの可溶性形態はその後、このレセプターの細胞外リガンド結合ドメインのみを含むと同定された。例えば、TNFレセプターの可溶性形態は、尿および血清で見出され（米国特許第5,843,789号およびNoph

arら、EMBOJ., 9(10):3269-3278, 1990を参照のこと)、そして細胞表面TNF-レセプターのタンパク分解切断により生じることが示されている(Wallachら、Agents Actions Suppl., 35:51-57 1991)。レセプター分子のこれらの可溶性形態は、そのレセプターに対するTNF結合を妨害するだけでなく、TNF構造を安定化し、そしてその活性を保存することにより、TNF活性の調節に関係し、従って、その効果のいくつかを延長する(Aderkara、Cytokine & Growth Factor Review, 7(3):231-240, 1996)。

【0011】

リガンドのTNFファミリーのメンバーの活性は、分泌およびレセプターの発現のレベルにおいてきちんと調節される。さらなる調節メカニズムが、細胞表面および生物学的液体において存在する特異的な阻害タンパク質の作用により提供される。これらの阻害タンパク質のいくつかは、レセプター分子の可溶性形態として同定されているが、多くのこれらのサイトカイン調節タンパク質の同定は、まだ未知である。しかし、これらの物質の産生における異常は、種々の疾患(免疫疾患および腫瘍性疾患を含む)の病態生理学に寄与し得る。インビボでのサイトカイン活性を調節する役割の上に、これらの調節分子は、非常に特異的なインヒビター/抗サイトカイン因子としての治療的使用、ならびに免疫機能の診断および評価における指標および種々の自己免疫疾患および悪性疾患における増殖パラメーターとしての治療的使用について有意な潜在性を保持する。

【0012】

健康および疾患におけるリガンド(およびそれらのレセプター)のTNFファミリーの重要な役割から、疾患および病理学的状態を診断および処置することにおける使用のために、ファミリーのさらなるメンバーを同定し、単離し、そして特徴付ける必要性が存在する。

【0013】

(発明の要旨)

本発明は、新規のセリン/トレオニンキナーゼファミリーおよびその使用に関

する。より詳細には、本発明は、新規のF h m核酸分子およびコードされるポリペプチド、ならびにそれらの使用に関する。

【0014】

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

(a) 配列番号3に示すヌクレオチド配列；

(b) 配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で(a)または(b)の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号3に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(d) (a)～(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0015】

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

(a) GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFitおよびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定した場合、4に示すポリペプチドに少なくとも約70、75、80、85、90、95、96、97、98または99パーセント同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、このポリペプチドが、配列番号4に示すコードされるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号3に示すヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

(d) 配列番号3～4のいずれかに示す1～251アミノ酸残基の置換および

ノまたは欠失を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

(f) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)~(e)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；ならびに

(g) (a)~(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0016】

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

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮化およびノまたはN末端短縮化を有する配列番号4に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

列；

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

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で(a)～(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、そのコードするポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；および

(h) (a)～(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0017】

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

(a) 配列番号4に示す成熟アミノ酸配列であって、残基1で成熟アミノ末端を含み、必要に応じてさらに、アミノ末端メチオニンを含む、成熟アミノ酸配列；

(b) 配列番号4のオルソログについてのアミノ酸配列であって、そのポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) GAP、BLASTP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFitおよびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定した場合、配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも約70、75、80、85、90、95、96、97、98または99パーセント同一であるアミノ酸配列であって、そのポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む、配列番号4に示すアミノ酸配列のフラグメントであって、このポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、フラグメント；

(e) 配列番号4に示すアミノ酸配列または(a)～(c)の少なくとも1つのいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列であって、このポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ

酸配列。

【0018】

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

(a) 少なくとも1つの保守的アミノ酸置換を有する配列番号4に示すアミノ酸配列であって、このポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号4に示すアミノ酸配列であって、このポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号4に示すアミノ酸配列であって、該ポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

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

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮化およびN末端短縮化からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号4に示すアミノ酸配列であって、このポリペプチドが、配列番号4に示すポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0019】

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

【0020】

本発明はまた、本明細書中に示す単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示す組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、ならびにこの宿主細胞を培養する工程および必要に応じてこのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含するFhmポリペプチドを産生する方法を提供する。

【0021】

F h mポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた本発明によって包含される。F h m核酸分子は、発現および増加したレベルのF h mポリペプチド（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で動物中に導入される。トランスジェニック非ヒト動物は好ましくは、哺乳動物である。

【0022】

本発明のF h mポリペプチドの誘導体もまた提供される。

【0023】

本発明のF h mポリペプチドを特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）がさらに提供される。このような抗体およびペプチドは、作用性または拮抗性であり得る。

【0024】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチドまたは選択的結合因子、および1以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物もまた、本発明によって包含される。薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するように用いられる。本発明はまた、ポリペプチド、核酸分子および選択的結合因子を使用する方法に関する。本発明はまた、膜中にカプセル化されたF h mポリペプチドを投与するためのデバイスを提供する。

【0025】

本発明のF h mポリペプチドおよびF h m核酸分子を用いて、本明細書中に記載される疾患および障害を含む疾患および障害を処置、予防、改善、診断および/または検出し得る。生物学的サンプル、細胞サンプルまたは組織サンプルにおける発現分析は、F h mポリペプチドが、以下を含むがこれらに限定されない、TNF関連疾患の診断および/または処置において役割を果たし得ることを示唆する：後天性免疫不全症候群（AIDS）、貧血、自己免疫疾患、悪疫質、癌、大脳マラリア、糖尿病、汎発性血管内凝固症候群、甲状腺機能正常な病的症候群（erythroid sick syndrome）、出血性ショック、肝炎、インスリン抵抗性、らい、白血病、リンパ腫、髄膜炎、多発性硬化症、心筋虚血、肥満、移植器官の拒絶、慢性関節リウマチ、敗血症性ショック症候群、発

作、成人呼吸促進症候群（ARDS）、結核および多数のウイルス疾患。この発現は、診断薬剤（例えば、Fhmヌクレオチド）を用いて検出され得る。

【0026】

本発明は、被験体における、異常なレベルのFhmポリペプチドによって引き起こされるかまたは異常なレベルのFhmポリペプチドから生じる病理学的状態または病理学的状態に対する感受性を診断することを包含し、これは、Fhmポリペプチドの発現の、サンプル中の存在または量を決定する工程；および正常被験体またはより早い時期の該被験体のいずれか由来の生物学的サンプル、組織サンプルまたは細胞サンプル中のこのポリペプチドのレベルを比較する工程であって、病理学的状態に対する感受性が、このポリペプチドの発現の存在または量に基づく、工程を包含する。

【0027】

本発明はまた、Fhmポリペプチドに結合する試験分子を同定するための試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、Fhmポリペプチドを、試験分子と接触させる工程、およびポリペプチドに対する試験分子の結合の程度を決定する工程を含む。この方法はさらに、このような試験分子がFhmポリペプチドのアゴニストであるかまたはFhmポリペプチドのアンタゴニストであるかを決定する工程を包含する。本発明はさらに、Fhmポリペプチドの発現またはFhmポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0028】

Fhmポリペプチドの発現を調節する方法およびFhmポリペプチドのレベルを調整する（すなわち、上昇または低下させる）方法もまた本発明によって包含される。1つの方法は、動物に、Fhmポリペプチドをコードする核酸分子を投与する工程を包含する。別の方法では、Fhmポリペプチド発現を調節または調整するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるように、遺伝子治療、細胞治療およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0029】

驚くべきことに、Fhmポリペプチドは、広範な範囲の原発性ヒト腫瘍におい

て高度に発現された。それゆえ、本発明のポリペプチドおよびその有用な核酸 (nucleic acid) 中間体は、バックグラウンドから形質転換された細胞を区別する際の有用性が実証された。

【0030】

本発明の別の局面では、Fhmポリペプチドは、レセプターまたはその結合パートナー (「Fhmレセプター」または「Fhm結合パートナー」) を同定するために用いられ得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質または補因子についてのレセプターをクローニングするために広範に用いられている。例えば、SimonsenおよびLodish, Trends in Pharmacological Sciences, 15:437-441, 1994 およびTartagliaら, Cell, 83:1263-1271, 1995を参照のこと。FhmレセプターまたはFhm結合パートナーの単離は、Fhmポリペプチドシグナル伝達経路の新規のアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。

【0031】

このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、Fhmポリペプチドを結合し得る、可溶性Fhmリガンド、抗Fhm選択的結合因子 (例えば、Fhm抗体およびその誘導体)、低分子、ペプチドもしくはそれらの誘導体、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらの任意のものは、本明細書中に記載される疾患または障害を含む、1以上の疾患または障害を潜在的に処置するために用いられ得る。

【0032】

特定の実施形態では、Fhmポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、Fhmポリペプチドと相互作用してその活性を調節する、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子であり得る。

【0033】

本発明の別の局面では、Fhmポリペプチドは、そのレセプター (「Fhmレセプター」) を同定するために用いられ得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質リガンドについてのクローンレセプターをクローニングするた

めに広範に用いられている。例えば、H. SimonsenおよびH. F. Lodish, Trends in Pharmacological Sciences, 第15巻, 437-44115:437-44, 1994およびTartagliaら, Cell, 83:1263-1271, 1995を参照のこと。Fhmレセプターの単離は、Fhmポリペプチドシグナル伝達経路の新規のアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性Fhmレセプター、抗Fhmレセプター選択的結合因子(例えば、抗体およびその誘導体)、低分子およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらの任意のものは、本明細書中に記載される疾患または障害を含む、1以上の疾患または障害を処置するために用いられ得る。

【0034】

(発明の詳細な説明)

本明細書におけるセクションの見出しは、組織化の目的のみのためであり、そこに記載される対象物を限定すると解釈されるべきではない。

【0035】

(定義)

用語「Fhm遺伝子」、「Fhm核酸分子」、または「Fhmポリヌクレオチド」とは、配列番号4に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、または本質的に配列番号4に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列から構成される、配列番号3に記載のヌクレオチド配列を含むか、または本質的に、配列番号3に記載のヌクレオチド配列から構成される核酸分子、あるいはこれらに関する核酸分子をいう。「関連する」核酸分子は、配列番号3に示されるヌクレオチド配列と約70%同一であるヌクレオチド配列を含むか、または本質的にこのようなヌクレオチド配列から構成されるか、あるいは配列番号4に示されるアミノ酸配列と約70%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、または本質的にこのようなヌクレオチド配列から構成される。好ましい実施形態において、このヌクレオチド配列は、配列番号3に示されるヌクレオチド配列に、約75%、または約80%、また

は約85%、または約90%、または約95、96、97、98、もしくは99%同一であるか、あるいはこのヌクレオチド配列は、配列番号4に示されるポリペプチド配列に、約75%、または約80%、または約85%、または約90%、または約95、96、97、98、もしくは99%同一であるポリペプチドをコードする。関連する核酸分子はまた、上記のFhm核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、少なくとも約10の連続するヌクレオチド、または約15、もしくは約20、もしくは約25、もしくは約50、もしくは約75、もしくは約100、または約100より大きい連続するヌクレオチドである。関連する核酸分子はまた、上記のFhm核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、少なくとも約25のアミノ酸残基、または約50、もしくは約75、もしくは約100、もしくは約100より大きいアミノ酸残基のポリペプチドをコードする。関連する核酸分子はまた、配列番号4のポリペプチドに比較して、1~251アミノ酸残基の置換および/または欠失を含むか、または本質的にこれから構成されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。関連するFhmリガンド核酸分子は、本明細書に規定される中程度または高度にストリンジェントな条件下で、任意の上記の核酸分子とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むような分子を含む。好ましい実施形態では、関連する核酸分子は、中程度もしくは高度にストリンジェントな条件下で、配列番号3に示される配列と、またはポリペプチド(このポリペプチドは、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む)をコードする分子と、または上記の核酸フラグメントと、または上記に規定されるポリペプチドをコードする核酸フラグメントと、ハイブリダイズする配列を含む。関連する核酸分子が上記の核酸のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含むこと、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的な配列を含むことがまた理解される。

【0036】

用語「Fhmポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体上の所定の遺伝子座を占める、いくつかの可能性のある天然に存在する別の形態の遺伝子の1つをいう。

【0037】

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

【0038】

用語「発現ベクター」とは、宿主細胞における使用に適切であり、かつ挿入された異種核酸配列の発現を指向するか、および/または制御する核酸配列を含む、ベクターをいう。発現は、転写、翻訳およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスを含むがこれらに限定されない。

【0039】

用語「Fhmポリペプチド」とは、配列番号4および関連ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、以下が挙げられる：Fhm対立遺伝子改変体、Fhmスプライス改変体、Fhmフラグメント、Fhm誘導體、Fhm置換改変体、Fhm欠失改変体、および/またはFhm挿入改変体、Fhm融合ポリペプチド、ならびにFhmオルソログ。Fhmポリペプチドは、本明細書に規定されるように、成熟ポリペプチドであり得、そして調製方法によっては、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

【0040】

用語、Fhmポリペプチドフラグメントとは、配列番号4に示されるFhmポリペプチドの全長アミノ酸配列未満を含むペプチドまたはポリペプチドをいう。このようなフラグメントは、例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）の短縮化、カルボキシ末端の短縮化、および/またはアミノ酸配列の内部欠失から生じ得る（ここで、得られたポリペプチドは、少なくとも6アミノ酸またはそれ以上の長さである）。Fhmフラグメントは、選択的RNAスプライシングからか、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。

【0041】

好ましい実施形態において、短縮は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または100アミノ酸より多いアミノ酸を含む。このように産生されたポリペプチ

ドフラグメントは、約25連続するアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含む。このようなFhmポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、Fhmポリペプチドに対する抗体を生成するために用いられ得ることが理解される。

【0042】

用語「Fhmポリペプチド改変体」とは、配列番号4に記載のFhmポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を有するか、または有さない）に比べて、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および/またはFhmフラグメント）、および/または付加（例えば、内部付加および/またはFhm融合ポリペプチド）を含むアミノ酸配列を含むFhmポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在し得る（例えば、Fhmポリペプチド対立遺伝子改変体、Fhmポリペプチドオルソログ、またはFhmスプライス改変体）か、または人工的に構築され得る。このようなFhm-ポリペプチド改変体は、このような改変体をコードする対応する核酸分子から調製され得る。この核酸分子は、配列番号3に記載の野生型Fhm-レセプターポリペプチドのDNA配列から変化しているDNA配列を有する。

【0043】

用語「Fhm融合ポリペプチド」、「Fhm融合ポリペプチド」とは、配列番号4に記載のポリペプチド、Fhmポリペプチド対立遺伝子改変体、Fhmポリペプチドオルソログ、Fhmポリペプチドスプライス改変体、またはFhmポリペプチド改変体（配列番号4に記載のFhmポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸欠失、置換、または内部付加を有する）のアミノ末端またはカルボキシ末端での1つ以上のアミノ酸（例えば、異種ペプチドまたは異種ポリペプチド）の融合物をいう。

【0044】

用語「Fhmポリペプチド誘導體」とは、Fhmポリペプチド改変体、またはそのフラグメントをいい、これは、例えば、1つ以上の水溶性ポリマー、N結合

型炭水化物、O結合型炭水化物、糖、リン酸、および/または他のこのような分子の共有結合によって、化学的に修飾されている。このような修飾は、精製タンパク質または粗タンパク質の標的アミノ酸残基を有機誘導体化剤（選択した側鎖または末端残基と反応し得る）と反応させることによって分子中に導入され得る。得られた共有誘導体は、また、生物学的活性について重要な残基を同定することを指向するプログラムにおいて有用である。この誘導体は、ポリペプチドに結合した分子の型または位置のいずれかの点で、天然に存在するFhmポリペプチドとは異なる様式で改変される。誘導体はさらに、Fhmポリペプチドに天然に結合された1つ以上の化学基の欠失を含む。

【0045】

用語「生物学的に活性なFhmポリペプチド」、「生物学的に活性なFhmポリペプチドフラグメント」、「生物学的に活性なFhmポリペプチド改変体」、および「生物学的に活性なFhmポリペプチド誘導体」とは、生物学的アッセイにおいてTNF-レセプタースーパー遺伝子（タンパク質）ファミリーの1つ以上のメンバーに結合する能力のような、Fhmポリペプチドの少なくとも1つの活性の特徴を有するFhmポリペプチド（このポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列を含む）をいう。Fhmポリペプチドの免疫学的フラグメントは、Fhmフラグメントに対する抗体を宿主動物中に誘導し得るフラグメントである。

【0046】

用語「Fhmポリペプチドオルソログ」とは、配列番号4に記載されるFhmポリペプチドアミノ酸配列に対応する別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのFhmポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0047】

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

変を含み得る。

【0048】

用語「抗原」は、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得る分子または分子の一部であって、そしてさらに、その各抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生するために動物において用いられ得る、分子または分子の一部をいう。

【0049】

用語、「ムテイン」は、Fhmポリペプチドの変異体タンパク質、ポリペプチド、改変体、アナログまたはフラグメントをいう。Fhmのムテインは、欠失、挿入、置換、点変異、短縮化、付加、転位、PCR増幅、部位特異的変異誘発、または当該分野で公知の他の方法によって調製され得る。

【0050】

用語「有効量」および「治療的に有効な量」とは、患者に意味のある利益（すなわち、処置、治癒、予防、または状態の緩和）をもたらすために、上記のTNFレセプター遺伝子ファミリーの1つ以上のメンバーの1つ以上の生物学的活性のレベルの観察可能な変化を支持するために必要なFhmポリペプチド（またはFhmアンタゴニスト）の量をいう。個々の活性成分について適用する場合、用語、単独で投与される（administered alone）とは、その成分が単独であることをいう。組合せ（combination）に適用される場合、この用語は、続けてか、または同時に、組合せて投与した場合、治療効果を生じる活性成分の組合せた量をいう。本発明を実施する際に用途を有するFhmポリペプチドは、天然に生じる全長ポリペプチド、または短縮化ポリペプチドもしくは改変相同体もしくはアナログまたは誘導體もしくはペプチドフラグメントであり得る。例示的アナログとしては、2つの種の間で1つ以上の不一致（divergent）アミノ酸が別の種由来の不一致アミノ酸で置換されるものが挙げられる。不一致アミノ酸はまた、任意の他のアミノ酸（これが保存的アミノ酸であっても、非保存的アミノ酸であっても）で置換され得る。

【0051】

用語「同一性（identity）」は、当該分野で公知のように、2つ以上

のポリペプチド分子、または2つ以上の核酸分子の配列の間において、この配列を比較することによって決定される、関係をいう。当該分野では、「同一性」はまた、核酸分子またはポリペプチド配列の配列関連性の程度（この場合、おそらく、2つ以上のヌクレオチドまたは2つ以上のアミノ酸配列のストリングの間の一致により決定されるような）を意味する。「同一性」は、特定の算術モデルのコンピュータプログラム（すなわち、アルゴリズム）によって位置付けられた、ギャップ整列（もし存在するならば）を有する2つ以上の配列のより短い方の間の同一性一致のパーセントを測定する。用語「類似性（similarity）」は、関連の概念であるが、「同一性」とは対照的に、同一性適合および保存的置換適合の両方を含む類似性の尺度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば、10/20の同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換であるならば、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、両方とも50%である。同じ例で、さらに5つの位置があり、それが保存的置換であるならば、同一性パーセントは、50%のままであるが、類似性パーセントは75%（15/20）である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド配列の間の類似性パーセントの程度は、これらの2つの配列の間の同一性パーセントよりも高い。

【0052】

用語「単離された核酸分子」とは、以下のような本発明の核酸分子をいう：（1）タンパク質、脂質、炭水化物、または全DNAが供給源細胞から単離された場合に一緒に天然に見出される他の物質の、少なくとも約50%から分離された核酸分子、（2）「単離された核酸分子」が天然において結合される、ポリヌクレオチドの全体または部分に結合していない核酸分子、（3）天然において結合していないポリヌクレオチドに作動可能に連結された核酸分子、または（4）比較的大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然に存在しない核酸分子。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、実質的に任意の他の夾雑核酸分子がないか、あるいはポリペプチド産生における使用、または治療用途、診断用途、予防用途もしくは研究用途を妨害する、天然の環境において見出される他の夾雑物を含まない。

【0053】

用語「単離されたポリペプチド」とは、以下のような本発明のポリペプチドをいう：(1) ポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または供給源細胞から単離された場合に天然に見出される他の物質の、少なくとも約50%から分離されたポリペプチド、(2) 「単離されたポリペプチド」が天然において結合されているポリペプチドの全体または部分に(共有結合性の相互作用または非共有結合性の相互作用によって)結合していないポリペプチド、(3) 天然に結合されないポリペプチドに(共有結合性の相互作用または非共有結合性の相互作用によって)作動可能に連結されたポリペプチド、または(4) 天然に存在しないポリペプチド。好ましくは、単離されたポリペプチドは、実質的に任意の他の夾雑ポリペプチドがないか、またはその治療用途、診断用途、予防用途または研究用途を妨害する、天然の環境において見出される他の夾雑物を含まない。

【0054】

用語「核酸配列」または「核酸分子」とは、DNA配列またはRNA配列をいう。この用語は、DNAまたはRNAの任意の公知の塩基アナログから形成された分子を含み、例えば、以下を含むが、これらに限定されない：4-4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、シュードイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシ-メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルシュードウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキユーオシン、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン(oxybutoxosine)、シュードウラシル、キュ

ーオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、シュードウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、および2, 6 - ジアミノプリン。

【0055】

用語「天然に存在する」または「ネイティブ」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的材料に関して使用される場合、天然に見出されかつ人によって操作されていない材料をいう。同様に、「天然に存在しない」または「非ネイティブ」は、本明細書中において使用される場合、天然には見出されないか、または人によって構造的に変更されたかもしくは合成された材料をいう。

【0056】

用語「作動可能に連結された」は、隣接配列の配置方法をいうために本明細書中に使用される。ここで、このように記載される隣接配列は、その有用な機能を実行するように構成されるかまたは組立てられる。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、コード配列の複製、転写および/または翻訳をもたらし得る。例えば、プロモーターがコード配列の転写を指向し得る場合、このコード配列は、このプロモーターに作動可能に連結される。隣接配列は、正確に機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写される介在配列は、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そして、このプロモーター配列はなお、このコード配列に「作動可能に連結された」とみなされ得る。

【0057】

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

【0058】

用語「選択的結合因子」は、F h mポリペプチドに対して特異性を有する分子

をいう。本明細書中に使用される場合、用語「特異的」および「特異性」は、ヒトFhmポリペプチドに結合するがヒト非Fhmポリペプチドに結合しない、選択的結合因子の能力をいう。しかし、選択的結合因子が、配列番号4に示されるようなポリペプチドのオルソログ(すなわち、その種間のバージョン(例えば、マウスポリペプチドおよびラットポリペプチド))もまた結合し得ることが、理解される。

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

用語「形質転換」は、本明細書中に使用される場合、細胞の遺伝特徴における変化をいい、そして細胞は、変更されて新規DNAを含む場合、形質転換されている。例えば、細胞は、そのネイティブな状態から遺伝的に変更された場合、形質転換されている。トランスフェクションおよび形質導入に続いて、形質転換DNAは、細胞の染色体へ物理的に介入させることによって、細胞のDNAと再び

合わせ得、これは、複製されることなくエピソームエレメントとして一過性に維持され得るか、またはプラスミドとして独立して複製され得る。細胞は、DNAが細胞の分裂と共に複製される場合、安定に形質転換されているとみなされる。

【0062】

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

【0063】

（核酸分子および/またはポリペプチドの関連性）

関連する核酸分子が、配列番号3の核酸分子の対立遺伝子またはスプライス改変体を含み、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むことが、理解される。関連する核酸分子はまた、配列番号4のポリペプチドと比較して、1つ以上のアミノ酸残基の置換、変更、付加、および/または欠失を含むか、またはこれらから本質的になるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0064】

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

【0065】

さらに、関連するFhm核酸分子としては、本明細書中に規定されるような中程度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号3の核酸分子の完全な相補配列とか、配列番号4に示されるようなアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子の完全な相補配列とか、または本明細書中に規定されるような核酸フラグメントの完全な相補配列とか、または本明細書中に規定されるようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの完全な相補配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が挙げられる。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供されるFhm配列を用いて調製されて、関連する配列に関して、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、

または合成DNAライブラリーをスクリーニングし得る。既知の配列と有意な同一性を示すFhmポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列の領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこのような領域は、スクリーニングのためのプローブを設計するために使用され得る。

【0066】

用語「高度にストリンジェントな条件」は、配列が高度に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そして有意に不一致な(mismatched)DNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、0.0015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、65~68、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および50% ホルムアミド、42 である。Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N, Y. 1989); およびAndersonら、Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England) Limited, Oxford, Englandを参照のこと。よりストリンジェントな条件(例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤)を、使用してもよい; しかし、ハイブリダイゼーションの速度は、影響される。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニル-ピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(NaDodSO4またはSD

S)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子DNA(または別の非相補的DNA)、および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH6.8~7.4で実施されるが;代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpH独立である。Andersonら、Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited(Oxford, England)を参照のこと。

【0067】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る:

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

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

【0068】

用語「中程度に」ストリンジェントな条件は、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりもより大きい程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、50~65、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37~50 である。例として、0.0

15 M ナトリウムイオン中、50 の「中程度にストリンジェントな」条件は、約21%の不一致を許容する。

【0069】

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

【0070】

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

$T_m = 1\text{つのA-T塩基につき } 2 + 1\text{つのG-C塩基対につき } 4$ によって提供される。⁺6×クエン酸ナトリウム塩（SSC）におけるナトリウムイオン濃度は、1 Mである。Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes、683頁、BrownおよびFox（編）（1981）を参照のこと。オリゴヌクレオチドに対して高度にストリンジェンシーな洗浄条件は、通常、6×SSC、0.1% SDSにおいて、このオリゴヌクレオチドの T_m の0～5 下の温度である。

【0071】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、配列番号3に示されるようなヌクレオチド配列に約70パーセント（70%）同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号4に示されるポリペプチドに約70パーセント（70%）同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこれから本質的になる。好ましい実施形態において、このヌクレオチド配列は、配列番号3に示されるヌクレオチド配列に、約75パーセント、または約80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95、96、97、98または99%同一であるか、あるいは、この

ヌクレオチド配列は、配列番号4に示されるポリペプチド配列に、約75パーセント、または約80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95、96、97、98、または99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。

【0072】

核酸配列における差異は、配列番号4のアミノ酸配列と比較して、保存的変更のアミノ酸配列または非保存的変更のアミノ酸配列を生じ得る。

【0073】

配列番号4のアミノ酸配列に対して保存的な変更（またはコード化ヌクレオチドに対する対応する変更）は、天然に存在するFhmポリペプチドに類似した機能特徴および化学特徴を有するFhmポリペプチドを生成する。対照的に、Fhmポリペプチドの機能特徴および/または化学特徴における実質的な変更は、配列番号4のアミノ酸配列において置換を選択することによって達成され得、これは、(a)置換領域における分子骨格の構造（例えば、シートコンフォメーションまたはらせんコンフォメーション）、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、あるいは(c)大部分の側鎖、の維持に対するその影響がかなり異なる。

【0074】

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

【0075】

天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいてグループに分けられ得る：

- 1) 疎水性：N l r l o i s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- 2) 中性の親水性：C y s、S e r、T h r；
- 3) 酸性：A s p、G l u；

- 4) 塩基性: Asn、Gln、His、Lys、Arg;
 5) 鎖の方向に影響を与える残基: Gly、Pro; および
 6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

タンパク質に相互作用的な生物学的機能を与える疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、当該分野で理解される。Kyteら、J. Mol. Biol., 157: 105-131, 1982。特定のアミノ酸が、類似した疎水性親水性の指標またはスコアを有する他のアミノ酸に置換され得、そしてなお、類似した生物学的活性を保持するという事は公知である。疎水性親水性指標に基づいて変更を作製する際、疎水性親水性指標が ± 2 内であるアミノ酸の置換が好ましく、疎水性親水性指標が ± 1 内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして疎水性親水性指標が ± 0.5 内であるアミノ酸置換がなおより特に好ましい。

【0079】

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

【0080】

以下の親水性値は、これらのアミノ酸残基に対して割りあてられる：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；（-2.5）およびトリプトファン（-3.4）。類似した親水性値に基づいて変更を作製する際、親水性値が±2内であるアミノ酸の置換が好ましく、親水性値が±1内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして親水性値が±0.5内であるアミノ酸置換がなおより特に好ましい。当業者はまた、親水性に基づいて、一次アミノ酸配列からエピトープを同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」ともいわれる。

【0081】

所望のアミノ酸置換（保存的または非保存的にかかわらず）は、そのような置換が所望されるときに当業者によって決定され得る。例えば、アミノ酸置換は、Fhmポリペプチドの重要な残基を決定するために使用され得るか、または本明細書中に記載されるFhmポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させるために使用され得る。

【0082】

例示的なアミノ酸置換を、表Iに示す。

【0083】

【表1】

表 I
アミノ酸置換

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

当業者は、周知技術を用いて配列番号4に示されるポリペプチドの適切な改変体を決定し得る。活性を崩壊させずに変更され得るその分子の適切な領域を決定するために、当業者は、活性に関して重要であると考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来または他の種由来の、類似した活性を有する類似したポリペプチドが既知の場合、当業者は、Fhmポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似したポリペプチドと比較し得る。そのような比較を用いて、当業者は

、類似したポリペプチドの間で保存されているその分子の残基および部分を同定し得る。そのような類似したポリペプチドに対して保存されていないF h mポリペプチドの領域における変化は、F h mポリペプチドの生物学的活性および/または構造に逆の影響をおそらくほとんど与えないことが理解される。当業者はまた、たとえ比較的保存された領域においても、活性を維持しながら天然に存在する残基を化学的に類似したアミノ酸で代用し得る（保存的アミノ酸残基置換）ことを理解する。従って、生物学的活性または構造に対して重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を崩壊させることなく、またはポリペプチド構造に逆の影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0084】

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

【0085】

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

ら集められた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が単独または他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0086】

多数の科学刊行物が、二次構造の推測に向けられている。Moult J.、*Curr. Op. in Biotech.*、7(4):422-427、1996、Chouら、*Biochemistry*、13(2):222-245、1974; Chouら、*Biochemistry*、113(2):211-222、1974; Chouら、*Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*、47:45-148、1978; Chouら、*Ann. Rev. Biochem.*、47:251-276およびChouら、*Biophys. J.*、26:367-384、1978を参照のこと)。さらに、コンピュータプログラムが、現在利用可能であり、二次構造の予測によって補助する。二次構造を推測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%よりも大きい配列同一性、または40%よりも大きい配列類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長により、二次構造の推測可能性(ポリペプチド構造またはタンパク質構造内の潜在的な折り畳みの数を含む)の促進がもたらされた。Holmら、*Nucl. Acid. Res.*、27(1):244-247、1999を参照のこと。所定のポリペプチドもしくはタンパク質における限定された数の折り畳みが存在すること、および一旦構造の臨界の数が決定されると、構造予測が劇的により正確になること、が示唆されている(Brennerら、*Curr. Op. Struct. Biol.*、7(3)369-376、1997)。

【0087】

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

ience. 253:164-170、1991; Gribskov \bar{a} 、Meth. Enzym., 183:146-159、1990; Gribskov \bar{a} 、Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13)4355-4358、1987)、および「進化的連鎖(evolutionary linkage)」(Home、前出、およびBrenner、前出を参照のこと)が、挙げられる。

【0088】

好ましいFhmポリペプチド改変体としては、グリコシル化改変体が挙げられ、ここで、グリコシル化部位の数および/または種類は、配列番号4に記載されるアミノ酸配列と比較して変更されている。1つの実施形態において、Fhmポリペプチド改変体は、配列番号4に記載のアミノ酸配列よりも多いかまたは少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xとして示されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型炭水化物鎖の付加のための潜在的に新たな部位を提供する。あるいは、この配列を除去する置換は、存在するN結合型炭水化物鎖を除く。また、N結合型炭水化物鎖の再配列が提供され、ここで、一つ以上のN結合型グリコシル化部位(代表的には、天然にある部位)が除去されて一つ以上の新しいN結合型部位が作製される。

【0089】

さらに好ましいFhm改変体としては、システイン改変体が挙げられ、ここで、一つ以上のシステイン残基が、配列番号4に記載されるアミノ酸と比較して、欠失されているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)を置換している。システイン改変体は、Fhmポリペプチドが、不溶性封入体の単離の後のように、生物学的に活性なコンフォメーションに折り畳まれなければならない場合に有用である。システイン改変体は、一般的に、ネイティブなタンパク質よりも少ないシステイン残基を有し、そして代表的には、不對システインから生じる相互作用を最少化するために偶数を有する。

【0090】

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

【0091】

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

【0092】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号4に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはFhmポリペプチド改変体は、ヒトIgGのFc領域の一つ以上のドメインに融合される。抗体は、2つの機能的に独立した部分（「Fab」として公知の変域ドメイン（抗原に結合する）および「Fc」として公知の定常ドメイン（食細胞による攻撃および補体活性化のようなエフェクター機能に関係する）を含む。Fcは、長い血清半減期を有し、一方、Fabは短寿命で

ある (Caponら、Nature、337:525-31、1989)。治療タンパク質と一緒に構築される場合、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテインA結合、補体固定およびおそらく胎盤輸送のような機能を組み込み得る (同書)。表IIは、当該分野で公知の特定のFc機能の使用を要約する。

【0093】

【表2】

表 II

治療タンパク質とを結合するFc融合

Fcの形態	融合レセプター	治療意味	参考文献
IgG1	CD30-LのN末端	ホジキン病 ; 新発性リンパ腫 ; T- 細胞白血病	米国特許 第5,480,981号
ユウス Fcg2a	IL-10	抗炎症 ; 移植拒絶	Zheng S. (1995), <i>J. Immunol.</i> , 154: 5590-5600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher S. (1996), <i>N. Engl. J. Med.</i> , 334: 1697-1702; Van Zee S. (1996), <i>J. Immunol.</i> , 156: 2221-2230
IgG, IgA, IgM, または IgE (第1ドメインを除く)	TNF レセプター	炎症、 自己免疫障害	米国特許第 5,808,029号 1998年9月15日発行
IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon S. (1989), <i>Nature</i> 337: 525-531
IgG1, IgG3	IL-2のN末端	抗癌、抗ウイルス	Harvill S. (1995), <i>Immunotech.</i> , 1: 95-105
IgG1	OPGのC末端	骨関節炎 ; 骨密度	WO 97/23614, 1997年7月23日公開
IgG1	レプチン (leptin)のN末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, 1997年12月11日出版
ヒト IgG1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley (1991), <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-569

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

【0094】

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

【0095】

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間に最も大きな一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定す

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

【0096】

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

【0097】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP（Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI）を使用して、配列同一性の割合が決定される2つのポリペプチドは、それらのそれぞれのアミノ酸の最適の一致（アルゴリズムによって決定される「一致したスパン（matched span）」）について整列される。ギャップオープニングペナルティ（gap opening penalty）（これは、平均ダイアゴナルの3倍として計算され；「平均ダイアゴナル」は、使用される比較マトリクスのダイアゴナルの平均であり；「ダイアゴナル」は

、特定の比較マトリクスによってそれぞれの完全なアミノ酸一致に割り当てられるスコアまたは数である) およびギャップエクステンションペナルティー(これは、通常ギャップオープニングペナルティーの1/10である)、ならびにPAM250またはBLOSUM62のような比較マトリクスがアルゴリズムとともに使用される。標準比較マトリクス(PAM250比較マトリクスについてDayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、第5巻、補遺35(3)、1978; BLOSUM62比較マトリクスについてHenikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:10915-10919、1992)もまたアルゴリズムによって使用される。

【0098】

ポリペプチド配列の比較に好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：

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

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

【0099】

ギャップペナルティー(Gap Penalty)：12

ギャップレングスペナルティー(Gap Length Penalty)：4

類似性の閾値：0。

【0100】

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

【0101】

核酸分子配列比較についての好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられ

る：

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, J. Mol Bio
l. 48: 443-4, 1970

比較マトリクス：一致 = +10、不一致 = 0

ギャップペナルティ：50

ギャップレングスペナルティ：3。

【0102】

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

【0103】

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

【0104】

（合成）

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

【0105】

（核酸分子）

核酸分子は、Fhmポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、種々の方法（化学合成、cDNAまたはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニングおよび/またはcDNAのPCR増幅を含む

がこれらに限定されない)で容易に得られ得る。

【0106】

本明細書中で使用される組換えDNA方法は、一般的に、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1989))および/またはAusubelら編(Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, NY(1994))に記載される方法である。

【0107】

本発明は、本明細書中に記載される核酸分子およびこのような分子を得るための方法を用意する。Fhmポリペプチドをコードする遺伝子が一つの種から同定された場合、その遺伝子の全てまたは一部は、同じ種からのオーソログス遺伝子または関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用され得る。プローブまたはプライマーは、Fhmポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源からのcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。

【0108】

さらに、配列番号3に記載される配列を有する核酸分子の一部または全てを使用してゲノムライブラリーをスクリーニングし、Fhmをコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的には、中程度または高いストリンジェンシーの条件は、スクリーニングのために使用されてスクリーニングから得られた偽陽性の数を最小にする。

【0109】

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

ングされる。抗体または結合パートナーは、検出可能な標識を用いて修飾されて所望のクローンを発現するそれらの細胞を同定する。

【0110】

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

【0111】

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

【0112】

Fhmポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の方法は、Engelsら, *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28:716-734, 1989に記載されるような当業者に周知の方法を使用する化学合成による。これらに方法には、特に、核酸合成のためのホスホトリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成のための好ましい方法は、標準的なホスホラミダイト化学を使用するポリマー支持合成である。代表的には、Fhmポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百個のヌクレオチドの長さである。約100個のヌクレオチドよりも

大きい核酸は、この方法を使用していくつかのフラグメントとして合成され得る。次いでこのフラグメントは、Fhmポリペプチドの全長ヌクレオチド配列を形成するために一緒に連結され得る。通常、ポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATG（これは、メチオニン残基をコードする）を有する。このメチオニンは、宿主細胞から産生されるポリペプチドが、宿主細胞から分泌されるように設計されるか否かに依存して、Fhmポリペプチドの成熟形態に存在してもよいし存在しなくてもよい。

【0113】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所与の宿主細胞におけるFhmポリペプチドの最適な発現のために変更されているコドンを含む。特定のコドンの改変は、発現について選択されるFhmポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法（例えば、所与の宿主細胞において高度に発現された遺伝子における使用に好ましいコドンを選択すること）によって行われ得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドンの性能について「Ecohigh.cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WIによって提供されている。他の有用なコドン頻度表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod」が挙げられる。

【0114】

他の実施形態において、核酸分子は、上で定義されるような保存的なアミノ酸置換をともなうFhm改変体をコードし、Fhm改変体は、一つ以上のN結合型またはO連結グリコシル化部位の付加および/または欠失、あるいは上記のFhmポリペプチドフラグメントを含む。さらに、この方法で改変されるDNAがTNF超遺伝子ファミリーのリガンドおよびレセプターの一つ以上のメンバーを見つけ出すことが可能であるポリペプチドをコードするならば、核酸分子は、本明

細書中に記載される F h m 改変体、フラグメント、および融合ポリペプチドの任意の組み合わせをコードし得る。

【0115】

(ベクターおよび宿主細胞)

F h m ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、標準的なライゲーション技術を使用して適切な発現ベクターに挿入され得る。ベクターは、代表的には、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される(すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じ得るように宿主細胞機構と適合性である)。F h m ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物、酵母、昆虫(バキュロウイルス系)、および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、F h m ポリペプチドが翻訳後修飾(例えば、グリコシル化および/またはホスホリル化)されるか否かに一部依存する。そうなら、酵母、昆虫または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth. Enz. vol. 185 D. V. Goeddel 編, Academic Press, San Diego CA, 1990を参照のこと。

【0116】

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

【0117】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」配列、すなわち F h m ポリペプチドコー

ド配列の5'または3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含み得；オリゴヌクレオチド分子は、ポリHis（例えば、ヘキサHis）、あるいは市販の抗体が存在するFLAG、HA（ヘマグルチニン（hemagglutinin）インフルエンザウイルス）またはmycのような別の「タグ」をコードする。必要に応じて、Fhm遺伝子はまた、例えばIgG Fc領域にN末端においてインフレームで融合され得る。このタグは、代表的にはポリペプチドの発現時にポリペプチドに融合し、そしてタグはFhmポリペプチドの循環半減期を長くし得るが、宿主細胞からのFhmポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立つ。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対して抗体を使用してカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、後に切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されるFhmポリペプチドから除去され得る。

【0118】

隣接配列は、同種（すなわち宿主細胞とおなじ種および/または菌株由来）、異種（すなわち、宿主細胞種または菌株とは異なる種由来）、ハイブリッド（すなわち、1つより多い供給源由来の隣接配列の組み合わせ）もしくは合成であり得るか、または隣接配列は、Fhm発現を制御するように通常機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、隣接配列が宿主細胞機構において機能的であり活性化され得るならば、任意の原核生物、任意の真核生物、任意の脊椎生物、任意の無脊椎生物、または任意の植物であり得る。

【0119】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野で周知のいくつかの方法の任意によって得られ得る。代表的には、Fhm遺伝子に隣接する配列以外の本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全ヌクレオチド配列が公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングについて本明細書中に記載される方法を使用して合成され得る。

【0120】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、それは、PCRを使用して、そして/あるいはゲノムライブラリーを同じかもしくは別の種由来の適切なオリゴヌクレオチドおよび/または隣接配列フラグメントでスクリーニングすることによって得られ得る。

【0121】

隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子でさえ含み得る大きな片のDNAから単離され得る。単離は、制限エンドヌクレアーゼ消化によって達成されて、適切なDNAフラグメントを産生し得、続いてアガロースゲル精製、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatsworth, CA）、または当業者に公知の他の方法を使用して単離され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0122】

複製起点は、代表的に、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、この開始点は、宿主細胞におけるベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、ある場合、Fhmポリペプチドの最適の発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製部位の開始点を含まない場合、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322（製品番号303-3s、New England Biolabs、Beverly, MA）からの複製の開始点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起源（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）あるいはHPVまたはBPVのようなパピローマウイルス）が、哺乳動物細胞におけるベクターをクローニングするために有用である。一般的に、複製成分の開始点は、哺乳動物発現ベクターに必要ではない（例えば、SV40の開始点は、しばしば、初期プロモーターを含むという理由だけで使用される）。

【0123】

転写終結配列は、代表的に、ポリペプチドコード領域の3'末端に位置し、転写を終結させるために役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G

- Cリッチフラグメントであり、ポリT配列が続く。この配列はライブラリーから容易にクローニングされるかまたはベクターの一部として市販さえされるが、この配列は本明細書中に記載されるような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0124】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地で増殖される宿主細胞の生存および増殖の必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞に抗生物質または毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるか、(b) 細胞の栄養要求性の欠乏を補うか；または(c) 複合培地から入手可能でない重要な栄養を供給するタンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子はまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択に使用され得る。

【0125】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の生成に非常に必要である遺伝子が、組換え細胞の連続的生成の染色体内でタンデムに繰り返されるプロセスである。哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体を、この形質転換体のみがベクターに存在する選択遺伝子によって生存するのに独特に適合する淘汰圧下に配置する。培地中の選択因子の濃度が連続的に変化する条件下で形質転換された細胞を培養し、それによって選択遺伝子とFhmをコードするDNAの両方の増幅を導くことによって、淘汰圧がかせられる。結果として、増加した量のFhmが増幅されたDNAから合成される。

【0126】

リボソーム結合部位は、通常mRNAの転写開始に必要とされ、そしてShine-Dalgarno配列(原核生物)またはKozak配列(真核生物)により特徴付けられる。このエレメントは典型的に、プロモーターに対して3'に

位置し、そして発現されるFhmポリペプチドのコード配列に対して5'に位置する。Shine-Dalgarno配列は、変化するが典型的にはポリプリンである(すなわち、高いA-G含量を有する)。多くのShine-Dalgarno配列が同定されており、これらのそれぞれは、本明細書中に記載される方法および原核生物ベクターにおいて使用される方法を使用して、容易に合成され得る。

【0127】

リーダー配列またはシグナル配列は、Fhmポリペプチドが合成される場合に、宿主細胞からのFhmポリペプチドの分泌を指向するために使用され得る。代表的に、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、Fhm核酸分子のコード領域に配置されるか、または直接Fhmポリペプチドコード領域の5'末端に配置される。多くのシグナル配列が同定されており、そして選択された宿主細胞において機能的であるこれらのいずれかが、Fhmの遺伝子またはcDNAとの結合体化に使用され得る。従って、シグナル配列は、Fhmの遺伝子またはcDNAに対して相同(天然に存在する)または非相同であり得、そしてFhmの遺伝子またはcDNAに対して相同または非相同であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。ほとんどの場合、シグナルペプチドの存在を介する宿主細胞からのFhmポリペプチドの分泌は、Fhmポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。

【0128】

シグナル配列は、ベクターの構成要素であってもよいし、またはこれはベクターに挿入されるFhm核酸分子の一部であってもよい。ネイティブなFhm DNAは、分子の翻訳後プロセッシングの間に切断されて成熟Fhmタンパク質産物を形成するシグナル配列をタンパク質のアミノ末端にコードする。ネイティブなシグナル配列を有するFhmヌクレオチド、ならびにネイティブなシグナル配列が欠失されそして相同シグナル配列で置換されたFhmヌクレオチドは、本発明の範囲内に含まれる。選択された相同シグナル配列は、宿主細胞により認識されそしてプロセッシングされた(すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断された)シグナル配列である。ネイティブなFhmシグナル配列を認識およびプロセシ

ングしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリン、または熱安定エンテロトキシンIIのリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。酵母分泌について、ネイティブなFhmシグナル配列は、酵母インベルターゼ、因子、または酸性ホスファターゼシグナル配列により置換される。哺乳動物細胞発現について、Fhmポリペプチドのネイティブなシグナル配列は十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0129】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において所望されるようないくつかの場合、種々のプレ配列を操作してグリコシル化または収率を改良し得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更するかまたはプレ配列を付加し得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、(成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して) - 1位に、発現に付随する1以上のさらなるアミノ酸残基を有し得、これは、完全に取り除かれていなくてもよい。例えば、最終タンパク質産物は、N末端に付加されたペプチダーゼ切断部位において見出される1または2つのアミノ酸を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、その酵素が成熟ポリペプチド内のそのような領域で切断する場合、所望のFhmポリペプチドの、わずかに短縮された形態を生じる。

【0130】

多くの場合、核酸分子の転写は、ベクター中の1以上のイントロンの存在により増加する；すなわち、ポリペプチドが真核生物宿主細胞(特に、哺乳動物宿主細胞)において産生される場合に特にその通りである。使用されるイントロンは、Fhm遺伝子(特に、使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合)内に天然に存在し得る。イントロンが、遺伝子(ほとんどのcDNAに関して)天然に存在しない場合、そのイントロンは、他の供給源から得られ得る。隣接配列およびFhm遺伝子に関するイントロンの位置は、イントロンが有効であるように転写されなければならない場合に、一般に重要である。従って、Fhm cDNA分子が転写されている場合、イントロンについての好ましい位置は、転写開始位置に対して3'であり、かつポリA転写終結配列に対し

て5'である。好ましくは、イントロンは、cDNAの1つの部位または他の部位(すなわち5'または3')上に位置し、その結果、イントロンは、そのコード配列を中断する。そのイントロンが挿入された宿主細胞と一致する場合に、任意の供給源(ウイルス、原核生物および真核生物(植物または動物)が挙げられる)由来の任意のイントロンを使用して、本発明を実施し得る。また、本明細書中には、合成イントロンが含まれる。必要に応じて、1以上のイントロンをベクターにおいて使用し得る。

【0131】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、それぞれ代表的には、宿主生物により認識され、そしてFhmポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されているプロモーターを含む。

【0132】

プロモーターは、特定の分子(例えば、Fhmをコードする分子)の転写および翻訳を制御する構成遺伝子(一般的には、約100~1000bp以内)の開始コドンに対して上流(5')に位置する非転写配列である。プロモーターは従来、2つのクラス(誘導プロモーターおよび構成プロモーター)のうちの一方に分類される。誘導プロモーターは、培養条件下でいくらかの変化(例えば、養分の存在もしくは非存在または温度の変化)に应答して、それらの制御下のDNAからの増加したレベルの転写を開始する。一方、構成プロモーターは、連続した遺伝子産生を開始する;すなわち、遺伝子発現に対する制御は、ほとんどまたはまったくない。種々の潜在的な宿主細胞により認識される大量のプロモーターが周知である。適切なプロモーターが、制限酵素消化により供給源DNA由来のプロモーターを取り除きそしてベクターへ所望のプロモーター配列を挿入することによりFhmをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなFhmプロモーター配列は、Fhmコード核酸分子の増幅および/または発現を指向するために使用され得る。しかし、異種プロモーターがネイティブプロモーターと比較して、発現タンパク質のより多い転写およびより高収率を可能にする場合、および使用のために選択された宿主細胞系と一致する場合、異種プロモーターが好ましい。

【0133】

原核宿主を用いる使用に適切なプロモーターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない： - ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ、トリプトファン (t r p) プロモーター系；および t a c プロモーターのようなハイブリッドプロモーター。他の公知の細菌性プロモーターもまた適切である。これらの配列は、公開されており、それにより、任意の有用な制限部位を供給することが必要とされる場合に、これにより当業者が、任意の有用な制限部位を供給する必要がある場合に、リンカーまたはアダプターを使用して所望のDNA配列にそれらを連結することを可能にする。

【0134】

酵母宿主を用いる使用に適切なプロモーターもまた、当該分野で周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物細胞との使用に適切なプロモーターは、周知であり、そして以下が挙げられるがこれらに限定されない： ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、そして最も好ましくはシミアンウイルス40 (S V 4 0) のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0135】

F h m 転写を制御する際の目的のプロモーターであり得るさらなるプロモーターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない： S V 4 0 初期プロモーター領域 (B e r n o i s t および C h a m b o n , N a t u r e , 2 9 0 : 3 4 - 3 1 0 , 1 9 8 1) ; C M V プロモーター；ラウス肉腫ウイルス (R S V) の 3 ' 末端反復配列 (L T R) において得られるプロモーター (Y a m a m o t o ら , C e l l , 2 2 : 7 8 7 - 7 9 7 , 1 9 8 0) ; ヘルペスチミジンキナーゼ (T K) プロモーター (W a g n e r ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . , 7 8 : 1 4 4 - 1 4 4 5 , 1 9 8 1) 、メタロチオネイン

遺伝子の調節配列 (Brinsterら, *Nature*, 296:39-42, 1982)、ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villa-Kamaroffら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-3731, 1978)、tacプロモーター (DeBoerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25, 1983)。以下の動物転写制御領域もまた使用され、これらは、組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている：膵臓腺房細胞において活性であるエラスターゼI遺伝子制御領域 (Swiftら, *Cell*, 38:639-646, 1984; Ornitzら, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409, 1986; MacDonald, *Hepatology*, 7:425-515, 1987)；膵臓細胞中で活性化されるインスリン遺伝子制御領域 (Hananan, *Nature*, 315:115-122, 1985)；リンパ系細胞中で活性化される免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedlら, *Cell*, 38:647-658, 1984; Adameら, *Nature*, 318:533-538, 1985; Alexanderら, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-1444, 1987)；精巣細胞、胸部細胞、リンパ系細胞および脂肪細胞において活性化されるマウス乳腺癌ウイルス (Lederら, *Cell*, 45:485-495, 1986)；肝臓において活性化されるアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkerら, *Genes and Devel.*, 1:268-276, 1987)；肝臓において活性化されるフェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlaufら, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-1648, 1985; Hammeら, *Science*, 235:53-58, 1987)；肝臓において活性化される α 1アンチトリプシン遺伝子制御配列 (Kelseyら, *Genes and Devel.*, 1:161-171, 1987)；骨髄性細胞において活性化されるグロビン遺伝子制御領域 (Mograら, *Nature*, 315:338-340, 1985; Kolliasら, *Cell*, 46:89-94, 1986)；脳中の稀突起膠細胞において活性化されるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead

ら, Cell, 48:703-712, 1987); 骨格筋において活性化されるミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Sani, Nature, 314:283-286, 1985); および視床下部において活性化される性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域(Masonら, Science, 234:1372-1378, 1986)。

【0136】

エンハンサー配列は、高等真核生物により本発明のFhmポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するためにベクターへ挿入され得る。エンハンサーは、DNAのシス作用性エレメントであり、通常約10~300bp長であり、これは、プロモーターに対して作用し、その転写を増加させる。エンハンサーは、比較的配向性でありそして位置依存性である。エンハンサーは、転写ユニットに対して5'および3'を見出されてきた。哺乳動物遺伝子から得られるいくつかのエンハンサー配列(例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインスリン)が公知である。しかし、代表的に、ウイルス由来のエンハンサーが使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化または上方制御についての例示的なエンハンサーエレメントである。エンハンサーは、Fhm核酸分子に対して5'位または3'位に位置するベクターへスプライスされ得るが、エンハンサーは、代表的には、プロモーターから5'部位に配置される。

【0137】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような出発ベクターから構成され得る。このようなベクターは、全ての所望の隣接配列を含んでも含まなくてもよい。上記の所望の隣接配列のうちの1以上がベクター中にまだ存在しない場合、これらは、それぞれ入手され、そしてベクターへ連結され得る。それぞれの隣接配列を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0138】

本発明を実施するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞および哺乳動物宿主細胞と適合するベクターである。このようなベクターとしては

、特に、pCRII、pCR3およびpcDNA3.1 (Invitrogen Company, Carlsbad, CA)、pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA)、pET15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pETL (BlueBacII; Invitrogen)、pDSR- (PCT公開番号WO90/14364) およびpFast BacDual (Gibco-Brl Grand Island, NY) が挙げられる。

【0139】

さらなる適切なベクターとしては、コスミドベクター、プラスミドベクターまたは改変ベクターが挙げられるがこれらに限定されない。しかし、このベクター系が選択された宿主細胞と適合しなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えば、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1ベースのファージミド, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA)、Taq-増幅されたPCR産物について設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPO™ TA Cloning (登録商標) Kit, PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体, Invitrogen, Carlsbad, CA)、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターおよびウイルスベクター (例えば、バキュロウイルス発現ベクター (pBacPAKプラスミド誘導体, Clontech, Palo Alto, CA))。

【0140】

ベクターが構築され、そしてFhmポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後、完成されたベクターは、増幅および/またはポリペプチド発現のために適切な宿主細胞へ挿入され得る。選択された宿主細胞へのFhmポリペプチドについての発現ベクターの形質転換は、周知の方法 (例えば、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション

、マイクロインジェクション、リポフェクチンもしくはD E A E - デキストラン法または、他の周知の技術)により達成され得る。選択された方法は、部分的に、使用される宿主細胞の型の関数 (f u n c t i o n) である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、そして例えば、S a m b r o o k ら (前出) に記載される。

【0141】

宿主細胞は、原核細胞宿主細胞 (例えば、E . c o l i) または真核細胞宿主細胞 (酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であり得る。適切な条件下で培養された場合、宿主細胞は、F h mポリペプチドを合成し、これは引き続き培養培地から収集され得るか (宿主細胞がF h mポリペプチドを配置へ分泌する場合)、またはF h mポリペプチドを産生する宿主細胞から直接収集される (分泌されない場合)。適切な宿主細胞の選択が、ウイルス因子 (例えば、発現レベル、活性にとって所望であるかまたは必要であるポリペプチド改変 (例えば、グリコシル化またはリン酸化) および生物学的に活性な分子への折り畳みの簡便性) に依存する。

【0142】

酵母細胞および哺乳動物細胞は、本発明の好ましい宿主である。このような宿主の使用は、それらがまたグリコシル化を含む翻訳後ペプチド改変を行い得る実質的な利点を提供する。多くの組換えDNAストラテジーが存在し、これは、これらの宿主において所望のタンパク質の産生に使用される強力なプロモーター配列および高コピー数のプラスミドを利用する。

【0143】

クローン化された哺乳動物遺伝子上の酵母認識リーダー配列は、ペプチド保有リーダー配列 (すなわち、プレペプチド) を産生しそして分泌する。哺乳動物細胞は、正しい折り畳みまたは正しい部位でのグリコシル化を含むタンパク質分子に対する翻訳後修飾を提供する。

【0144】

宿主として有用であり得る哺乳動物細胞としては、線維芽起源の細胞 (例えば、V E R OまたはC H O - K 1) およびそれらの誘導体が挙げられる。哺乳動物

宿主について、いくつかの潜在的なベクター系が、所望のFhmタンパク質の発現のために利用可能である。宿主の性質に依存して、広範な種々の転写調節配列および翻訳調節配列が使用され得る。転写調節シグナルおよび翻訳調節シグナルは、ウイルス供給源（例えば、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、シミアンウイルスなど）に由来し得、ここでこれらの調節シグナルは、高レベルの発現を有する特定の遺伝子と関連する。あるいは、哺乳動物発現産物（例えば、アクチン、コラーゲン、ミオシンなど）由来のプロモーターが使用され得る。抑制または活性化を可能にする転写阻害調節シグナルが分泌され得、その結果、遺伝子の発現が調節され得る。有用なシグナルは、温度感受性である調節シグナルである（その結果、温度を変化させることにより、発現が抑制もしくは阻害され得る）か、または化学調節（例えば、代謝産物）に供される。

【0145】

広く公知であるように、真核生物mRNAの翻訳は、開始メチオニンをコードするコドンにおいて開始される。この理由のために、真核生物プロモーターと、メチオニンをコードし得る（すなわち、AUG）任意の介在コドンを含まない所望のレセプター分子をコードするDNA配列との間の連結を確実にすることが好ましい。このようなコドンの存在は、結果として、融合タンパク質の形成（AUGコドンが、DNA配列をコードする所望のレセプター分子として同じリーディングフレーム中に存在する場合）またはフレームシフト変異（AUGコドンが、所望のFhmタンパク質コード配列として同じリーディングフレーム中に存在しない場合）のどちらかを生じる。

【0146】

Fhmタンパク質の発現はまた、原核細胞中で達成され得る。好ましい原核宿主としては、細菌（例えば、E. coli、バチルス属、ストレプトミセス属、シュードモナス属、サルモネラ属、セラチア属など）が挙げられる。最も好ましい真核生物宿主は、E. coliである。特別な目的の細菌宿主としては、E. coli K12株294（ATCC 31446）、E. coli X1776（ATCC 31537）、E. coli W3110（F⁻, λ⁻, 原栄養菌株（ATCC 27325））、および他の腸内細菌（例えば、ネズミチフス

菌または霊菌)ならびに種々のシュードモナス種が挙げられる。原核宿主は、発現プラスミド中のレプリコンおよび制御配列と適合しなければならない。

【0147】

原核細胞(例えば、E. coli、枯草菌、シュードモナス属、ストレプトミセス属など)中で所望のFhmタンパク質を発現するために、所望のレセプター分子をコードする配列を機能性原核プロモーターに作動可能に連結することが必要である。このようなプロモーターとしては、どちらの構成であってもよいが、好ましくは、調節可能(すなわち、誘導的または抑制解除的)である。誘導プロモーターの例としては、バクテリオファージのintプロモーター、およびpBR322の β -ラクタマーゼ遺伝子のblaプロモーターなどが挙げられる。誘導原核生物プロモーターの例としては、バクテリオファージ(P_L および P_R)の主要な右プロモーターおよび左プロモーター、ならびにE. coliのtrp、recA、lacZ、lacI、galおよびtacプロモーター、 β -アミラーゼ(Ulmaner, J. Bacteriol. 162:176-182, 1985)、枯草菌の28-特異的プロモーター(Gilman, Gene 32:11-20, 1984)、バチルス属のバクテリオファージのプロモーター(Gryczan, T. J., The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, Inc., New York, 1982)、およびストレプトミセス属プロモーター(Ward, Mol. Gen. Genet. 203:468-478, 1986)が挙げられる。原核生物プロモーターは、Glick(J. Ind. Microbiol. 1:277-282, 1987); Cenatiempo, Biochimie 68:505-516, 1986); およびGottesman, Ann. Rev. Genet. 18:415-442, 1984)により概説される。

【0148】

原核生物細胞における適切な発現はまた、遺伝子コード配列から上流のリボソーム結合部位の存在を必要とする。このようなりボソーム結合部位は、例えば、Gold(Ann. Rev. Microbiol. 35:365-404, 1

981)により開示されている。

【0149】

所望のFhmタンパク質コード配列および作動可能に連結されたプロモーターは、非複製DNA(またはRNA)分子(これは、植線であってもよいし、またはより好ましくは閉じられた共有結合環状分子であってもよい)としてレシピエントの原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。このような分子は、自律複製不可能であることから、所望のレセプター分子の発現は、導入配列の一過性の発現を介して生じ得る。あるいは、持続性発現は、宿主染色体へ導入された配列の組み込みを介して生じ得る。

【0150】

1つの実施形態では、所望の遺伝子配列を宿主細胞染色体へ組み込み得るベクターが使用される。細胞の染色体へ導入DNAを安定に組み込んだ細胞は、発現ベクターを含む宿主細胞の選択を可能にする1以上のマーカーを導入することによっても選択され得る。マーカーは、宿主中に栄養要求性(例えば、共通の酵母栄養要求性マーカーである`leu21`または`ura3`)、殺生剤(`biocide`)耐性(例えば、抗生物質)または重金属(例えば、銅)などを補い得る。この選択マーカー遺伝子は、発現されるDNA遺伝子配列に直接連結されていてもよいし、同時トランスフェクションにより同じ細胞に導入されてもよい。

【0151】

好ましい実施形態では、導入された配列は、レシピエント宿主における自律複製し得るプラスミドベクターまたはウイルスベクターへ組み込まれる。広範な種々のベクターのいずれかが、この目的のために使用され得る。特定のプラスミドベクターまたはウイルスベクターを選択する際の重要な因子(例えば、ベクターを含むレシピエントな細胞での簡便性)(特定の宿主において所望されるベクターのコピーの数;および異なる種の宿主細胞間をベクターを「シャトル」し得るに望ましいか否か)は、認識され得、そしてこれらのベクターを含まないレシピエントな細胞から選択され得る。

【0152】

一連の酵母遺伝子発現系のいずれかがまた使用され得る。このような発現ベク

ターの例としては、酵母の2ミクロンの環、発現プラスミド(YEP13、YVPおよびYRPなど)またはそれらの誘導体が挙げられる。このようなプラスミドは当該分野で周知である(Botsteinら, Miami Wnter. Symp. 19:265-274(1982); Broach, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 445-470頁(1981); Broach, Cell 28:203-204(1982))。

【0153】

哺乳動物宿主について、いくつかの可能なベクター系が発現のために利用可能である。染色体外プラスミドを自律複製を提供するDNAエレメントを使用するベクターの1つのクラスは、動物ウイルス(例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルスまたはSV40ウイルス)に由来する。ベクターの第2のクラスは、宿主染色体への所望の遺伝子配列の組み込みに依存する。導入DNAがそれらの染色体へ安定に組み込まれた細胞は、発現ベクターを含む宿主細胞の選択を可能にする1以上のマーカーを組み込むことによっても選択され得る。マーカーは、栄養要求性宿主に対してプロトトロピー(殺生物剤耐性(例えば、抗生物質)、または重金属(例えば、銅)など)を提供し得る。選択マーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に作動可能に連結されていてもよいし、または同時形質転換により同じ細胞へ導入されても良い。さらなるエレメントはまた、mRNAの最適な合成に必要とされ得る。これらのエレメントは、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルを含み得る。このようなエレメントを組み込んでいるcDNA発現ベクターは、Okayama, Mol. Cell. Biol. 3:280(1983), および他により記載される。好ましい真核生物ベクターとしては、PWLNEO、PSV2CAT、POG44、PXTI、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(Pharmacia)が挙げられる。

【0154】

好ましい原核生物ベクターとしては、E. coli中で複製され得るプラスミドのようなプラスミド(例えば、pBR322、ColE1、pSC101、pACYC 184、VX、pQE70、pQE60、pQE9、pBG、pD10、Phage script、psix174、pbmescript SK、pbsks、pNH8A、pNHIBa、pNH18A、pNH46A(SL rare gone)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5)が挙げられる。例えば、このようなプラスミドは、Maniatis, T.ら(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982))により開示される。Bacillusプラスミドとしては、pC194、pC221、pT127などが挙げられる。このようなプラスミドは、Gryczan, T. (The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, New York (1982) 307-329頁)により開示される。適切なストレプトミセス属プラスミドとしては、pISJ101(Kendallら, J. Bacteriol. 169: 4177-4183 1987)およびC31のようなストレプトミセス属バクテリオファージ(Chaterら, Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, 1986, 45-541頁)が挙げられる。ストレプトミセス属プラスミドは、Johnら(Rev. Infect. Dis. 8: 693-704, 1986, およびIzaki, K. (Jpn. J. Bacteriol. 33: 729-742 1978)により概説される。しかし、任意の他のプラスミドまたはベクターは、それらが宿主細胞中で複製可能および生存可能であるかぎり使用され得る。

【0155】

一旦、ベクターまたは構築物を含むDNA配列が発現のために調製されると、DNA構築物は、適切な宿主へ導入され得る。種々の技術(例えば、プロトプラ

スト融合物、リン酸カルシウム沈澱、エレクトロポレーションまたは他の従来技術)が、使用され得る。融合後、細胞は、培地中で増殖され、そして適切な活性についてスクリーニングされる。配列の発現は、Fhmタンパク質の産生を生じる。

【0156】

適切な宿主細胞または細胞株は、哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO; ATCC番号CCL61)、CHO DHFR細胞(Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 97:4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓(HEK), 293細胞もしくは293T細胞(ATCC番号CRL 1573)、または3T3細胞(ATCC番号CRL920))であり得る。適切な哺乳動物宿主細胞の選択ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物産生および精製のための方法は、当該分野で公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1(ATCC番号CRL 1650)およびCOS-7(ATCC番号CRL 1651)細胞株ならびにCV-1(ATCC番号CCL70)細胞株である。さらなる例示的な哺乳宿主細胞としては、形質転換された細胞株を含む、霊長類細胞株およびげっ歯類細胞株が挙げられる。正常な二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養に由来する細胞株、ならびに一次外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子において遺伝子型的に欠損していてもよいし、または優性に作用する選択遺伝子を含んでいてもよい。他の適切な哺乳動物細胞株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: Swiss、Balb-cもしくはNIHマウスに由来するマウス神経芽細胞種N2A細胞、HeLa細胞、マウスL-929細胞、3T3株またはHaKハムスター細胞株(これらはATCCから入手可能である)。各々これらの細胞株は、公知であり、そしてタンパク質発現の分野の当業者にとって利用可能である。

【0157】

本発明に適切な宿主細胞として同様に有用であるのは、細菌細胞である。例えば、E. coliの種々の株(例えば、HB101、DH5(ATCC No. 33694)、DH10、およびMC1061(ATCC No. 53330

)) が、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として周知である。B . s u b t i l i s、P s e u d o m o n a s s p p .、他のB a c i l l u s s p p .、S t r e p t o m y c e s s p p .などの種々の株もまた、本方法において使用され得る。

【0158】

当業者に公知の酵母細胞の多くの株もまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母株としては、例えば、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a eおよびP i c h i a p a s t o r i sが挙げられる。

【0159】

さらに、所望される場合、昆虫細胞系が、本発明において利用され得る。このような系は、例えば、K i t t sら (B i o t e c h n i q u e s 14 : 810 ~ 817、1993)、L u c k l o w (C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . 4 : 564 ~ 572、1993) およびL u c k l o wら (J . V i r o l . 67 : 4566 ~ 4579、1993) に記載される。好ましい昆虫細胞は、S f - 9およびH i 5 (I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A) である。

【0160】

グリコシル化F h mポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物 (例えば、ウシまたはヤギ) を使用し得、そしてその動物の乳汁中の本発明のグリコシル化ポリペプチドを入手し得る。F h mポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、一般に、植物中で生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞にて産生されるものと異なり、そしてヒト治療用途に適切でないグリコシル化生成物を生じ得る。

【0161】

(ポリペプチド産生)

F h m発現ベクターを含む (すなわち、形質転換またはトランスフェクトされた) 宿主細胞が、当業者に周知の標準的培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、その細胞の増殖および生存に必要な栄養素すべてを含む。E . c o l

i 細胞を培養するのに適切な培地は、例えば、Luria Broth (LB) および/または Terrific Broth (TB) である。真核生物細胞を培養するのに適切な培地は、Rosewell Park Memorial Media 1640 (RPMI 1640)、最少必須培地 (MEM)、Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) であり、これらすべては、培養される特定の細胞株により示される血清および/または増殖因子が補充され得る。昆虫培養に適切な培地は、必要な場合には yeastilate、ラクトアルブミン加水分解物および/またはウシ胎仔血清を補充した、グレース培地である。

【0162】

代表的には、形質転換細胞の選択的増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、この培地に補充物として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミド上に存在する選択マーカーエレメントにより決定される。例えば、その選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に添加される化合物は、カナマイシンである。選択的増殖培地のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリンおよびネオマイシンが挙げられる。宿主細胞により産生される Fhm ポリペプチドの量は、当該分野で公知の標準的方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定はしないが、ウェスタンブロット分析、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、HPLC 分離、免疫沈降、および/または活性アッセイ (例えば、DNA 結合ゲルシフトアッセイ) が挙げられる。

【0163】

Fhm ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計された場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地にて見出され得る。しかし、Fhm ポリペプチドが宿主細胞から分泌される場合、Fhm ポリペプチドは細胞質および/または核 (真核生物宿主細胞について) あるいは細胞質ゾル (細菌宿主細胞) に存在する。

【0164】

細胞内物質 (グラム陰性細菌について封入体を含む) が、当業者に公知の任意

の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および/または超音波処理、それに続く遠心分離によって、ペリプラズム/細胞質の中身を放出するように溶解され得る。

【0165】

Fhmポリペプチドが細胞質ゾルにおいて封入体を形成した場合、その封入体は、しばしば、内側細胞膜および/または外側細胞膜に結合し得、従って、遠心分離後に、主にペレット物質中に見出される。次いで、このペレット物質は、極端なpH状態で処理され得るか、またはカオトロピック剤（例えば、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体）を還元剤（例えば、ジチオスレイトール（アルカリ性pH）もしくはトリスカルボキシエチルホスフィン（酸性pH））の存在下で用いて処理され得て、封入体を遊離、破壊および可溶化し得る。ここで可溶化形態のFhmポリペプチドは、次いで、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。Fhmポリペプチドを単離することが所望される場合、単離は、本明細書中に記載される方法およびMarstonら（Meth. Enz. 182:264-275, 1990）に記載される方法のような、標準的方法を使用して達成され得る。

【0166】

いくつかの場合において、Fhmポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でないかもしれない。そのポリペプチドを「リフォールディング」すなわちその3次構造に変換してジスルフィド結合を産生するための種々の方法が、生物学的活性を回復するために使用され得る。このような方法は、可溶化されたポリペプチドを通常は7を超えるpHに、特定の濃度のカオトロップの存在下で曝すことを包含する。カオトロップの選択は、封入体可溶化のために使用される選択に非常に類似するが、通常このカオトロップは、より低い濃度で使用されそして可溶化に使用されるカオトロップと必ずしも同じではない。ほとんどの場合、リフォールディング/酸化溶液はまた、還元剤を含むかまたは還元剤プラスその酸化形態を特定の比で含んで、特定の酸化還元ポテンシャルを生じ、それによりそのタンパク質のシステイン架橋の形成を生じるようなジスルフィドシャッフリングを可能にする。一般的に使用される酸化還元カップルのいくつかとしては、システ

イン/シスタミン、グルタチオン (GSH) /ジチオビスGSH、塩化銅 (II)、ジチオスレイトール (DTT) /ジチアンDTT、2-メルカプトエタノール (ME) /ジチオ- (ME) が挙げられる。共溶媒が、リフォールディングの効率を高めるために必要であり、そしてこの目的に使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【0167】

封入体が、Fhmポリペプチドの発現の際に有意な程度まで形成されない場合は、そのポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。そのポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、上清からさらに単離され得る。

【0168】

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

【0169】

例えば、ポリヒスチジンはニッケルに大きな親和性および特異性で結合し (従ってannickel) ; 従ってニッケルのアフィニティーカラム (例えば、Qiagen (登録商標) ニッケルカラム) が、Fhmポリペプチド/ポリHisの精製に使用され得る。例えば、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、10.11.8節、John Wiley & Sons、New York、1993を参照のこと。

【0170】

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

【0171】

従って、精製に適切な手順としては、限定はしないが、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）と続くゲル溶出、ならびに調製的等電収束法（「Isoprime」マシーン/技術、Hoefler Scientific、San Francisco、CA）が挙げられる。いくつかの場合、2つ以上の精製技術が、純度の増加を達成するために組み合わせられ得る。

【0172】

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

【0173】

Fhmポリペプチドを得るための別の手段は、そのFhmポリペプチドが天然

で見出される生物学的サンプル（例えば、供給源組織および/または流体）からの精製を介する。このような精製は、上記のようなタンパク質精製のための方法を使用して実行され得る。精製間のFhmポリペプチドの存在は、例えば、組換え産生されたFhmポリペプチドもしくはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用して、モニターされ得る。

【0174】

核酸およびポリペプチドを産生するためのさらなる多数の方法が、当該分野で公知であり、そしてその方法は、Fhmに対する特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94:12297-12303、1997を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。また、Roberts、Curr. Opin. Chem. Biol. 3:263-273、1999も参照のこと。

【0175】

さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得る方法を記載する。この手順は、各々が5'ランダム配列、所定の中心配列、および3'ランダム配列を有する、オリゴヌクレオチドの不均質プールを産生することを包含する。生じた不均質プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞集団に導入される。次いで、この細胞の部分集団が、所定の生物学的機能を示す部分集団についてスクリーニングされる。この部分集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが、単離される。米国特許第5,763,192号、同第5,814,476号、同第5,723,323号および同第5,817,483号は、ペプチドもしくはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率的(stochastic)遺伝子もしくはそのフラグメントを産生すること、次いでこれらの遺伝子を、その確率的遺伝子によりコードされる1つ以上のタンパク質を産生する宿主細胞に導入することによって、なされる。次いで、この宿主細胞は、所望の活性を有するペプチドもしくはポリペプチドを産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0176】

ペプチドもしくはポリペプチドを産生するための別の方法は、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として公知である、Athersys, Inc.により出願されたPCT/US98/20094(WO99/15650)に記載され、このプロセスは、インサイチュ組換え方法による内因性遺伝子発現の活性化もしくは遺伝子の過剰発現を包含する。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同組換えもしくは非正統的(illegitimate)組換えによってその遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞に調節配列を組み込むことによって、活性化もしくは増加される。標的DNAは、まず、放射線に供され、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、最終的には遺伝子の前の途切れ目に位置し、その遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドもしくはポリペプチドの発現を生じる。

【0177】

これらの方法がまた、包括的IL-17様タンパク質発現ライブラリーを生じるために使用され得、このライブラリーが続いて種々のアッセイ(例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイ、および生物全体アッセイ(例えば、植物、マウスなど))における高スループット表現型スクリーニングに使用され得ることが、理解される。

【0178】

(Fhmのタンパク質、ポリペプチド、フラグメント、改変体およびムテイン)

本発明のポリペプチドは、単離されたFhmポリペプチドおよびそれに関するポリペプチド(本明細書中上記されるような、フラグメント、改変体、融合ポリペプチドおよび誘導体を含む)を包含する。

【0179】

本発明のFhmフラグメントは、そのポリペプチドのアミノ末端での短縮化(リーダー配列を含むかまたは含まない)、カルボキシ末端での短縮化、および/または内部での欠失から生じ得る。ほとんどの欠失および挿入、ならびに特に置

換は、F h mタンパク質の特徴での極端な変化を生じると予測されない。しかし、実行する前に置換、欠失もしくは挿入の正確な効果を予測することが困難である場合、当業者は、この効果が慣用的スクリーニングアッセイにより評価されることを認識する。例えば、改変体は、代表的には、F h mをコードする核酸の部位特異的変異誘発、組換え細胞培養物におけるその改変体核酸の発現、そして必要に応じてその細胞培養物からの精製により産生され、その精製は例えば、ポリクローナル抗F h m抗体カラム上でのイムノアフィニティー吸着（少なくとも1つの残りの免疫エピトープにその改変体を結合することによりその改変体を吸着するため）による。好ましい実施形態において、短縮化および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100を超えるアミノ酸を含む。そうして産生されたポリペプチドフラグメントは、約25個連続するアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含む。このようなF h mポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。

【0180】

本発明のF h mポリペプチド改変体は、配列番号4と比較して、1つ以上のアミノ酸置換、付加および/または欠失を含む。好ましい実施形態において、この改変体は、1~3、または1~5、または1~10、または1~15、または1~20、または1~25、または1~50、または1~75、または1~100、または100を超える、アミノ酸置換、挿入、付加および/もしくは欠失を有し、ここでその置換が、上記のように保守的であり得るか、または非保守的であり得るか、あるいはその組み合わせであり得る。より詳細には、F h m改変体は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含み得、この配列において、アミノ酸2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、

65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、
77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、
89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100
、101、102、103、104、105、106、107、108、109
、110、111、112、113、114、115、116、117、118、
119、120、121、122、123、124、125、126、127、
128、129、130、131、132、133、134、135、136、
137、138、139、140、141、142、143、144、145、
146、147、148、149、150、151、152、153、154、
155、156、157、158、159、160、161、162、163、
164、165、166、167、168、169、170、171、172、
173、174、175、176 - 251までからなる群からの1つ以上のアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている。この改変体は、カルボキシ末端またはアミノ末端（リーダー配列を含むかもしくは含まない）のいずれかに、アミノ酸残基の付加を有し得る。

【0181】

好ましいFhmポリペプチド改変体は、ネイティブFhmポリペプチドと比較してグリコシル化部位の数および/または型が変化している、グリコシル化改変体を含む。1つの実施形態において、Fhm改変体は、より多くの数またはより少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列A s n - X - S e rにより特徴付けられ、ここでXとして示されるアミノ酸残基は、プロリンを除く任意の型のアミノ酸であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型等鎖の付加のために可能な新規な部位を提供する。あるいは、この配列を除去するための置換が、既存のN結合型等鎖を除去する。また、1つ以上のN結合型グリコシル化部位（代表的には天然に存在する部位）が除去されかつ1つ以上の新規なN結合部位が産生される、N結合型等鎖の再構成も提供される。

【0182】

当業者は、周知の技術を使用して、ネイティブのFhmポリペプチドの適切な

改変体を決定し得る。例えば、生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子を適切な領域を推定し得る。また、当業者は、生物学的活性または構造に重要であり得る領域さえも、その生物学的活性を破壊することもしくはそのポリペプチド構造に不利に影響することなく、保存的アミノ酸置換に供され得ることを認識する。

【0183】

活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を予測するために、当業者は、活性に重要であると考えられる領域を標的とし得る。例えば、同じ種または他の種由来の類似の活性を有する類似のポリペプチドが公知である場合、当業者は、Fhmポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を行った後、当業者は、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を決定し得る。当業者は、保存されないFhm分子の領域での変化が生物学的活性および/または構造に不利に影響しそうにないことを知っている。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を保持するしつつ、天然に存在する残基に代わって化学的に類似するアミノ酸でおそらく置換し得る（例えば、保存的アミノ酸残基置換）。

【0184】

また、当業者は、活性もしくは構造に重要な類似のポリペプチド中の残基を同定する構造-機能研究を検討し得る。このような比較を考慮して、当業者は、類似のポリペプチド中の活性もしくは構造に重要なアミノ酸残基に対応するFhm中のアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、Fhmのこのような推定された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似のアミノ酸置換を選択し得る。

【0185】

利用可能な場合、当業者はまた、類似のポリペプチドにおける結晶構造、およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。その情報を考慮して、当業者は、その3次元構造に関するFhmポリペプチドのアミノ酸残基の整列を予測でき得る。当業者は、そのタンパク質の表面上にあると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を作製しないように選択し得る。なぜなら、そのような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。

【0186】

さらに、当業者は、各アミノ酸残基で単一アミノ酸置換を含む、試験改変体を産生し得る。この改変体は、本願に開示される活性アッセイを使用してスクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体についての情報を集めるために使用される、例えば、特定のアミノ酸残基への変化が活性の破壊を生じたことを発見した場合、このような変化を含む改変体が回避される。従って、このような実験から収集された情報に基づいて、受容可能なさらなる改変体を見出すように試みる場合、当業者は、さらなる置換が単独でかもしくは他の変異と組み合わせるいずれかで回避されるべきアミノ酸を決定し得る。

【0187】

本発明のFhmポリペプチドアナログは、Fhmポリペプチドのアミノ酸配列を関連ファミリーのメンバーと比較することにより決定され得る。例示的Fhmポリペプチド関連ファミリーのメンバーとしては、TNF-、TNK-、LyT-、FasL、CD40L、CD30L、OPGLおよびTRAILが挙げられるが、これらに限定されない。この比較は、Pileup整列(Wisconsin GCG Program Package)を使用すること、または保存領域および非保存領域内での複数のファミリーメンバーとの等価(重複)比較を使用することによって、達成され得る。

【0188】

図1に示されるように、Fhmポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号4)は、ヒトFasL、マウスFasL、ラットFasL、ヒトCD40L、マウスCD40L、マウスOPGL、ヒトOPGL、ヒトTRAIL、マウスTRAIL、ヒトCD30L、ヒトCD30L、ヒトLyT-、マウスLyT-、ヒトTNF-、マウスTNF-、ヒトTNF-、およびマウスTNF-(配列番号5-21)の対応する領域と整列される。他のFhmポリペプチドアナログは、これらの方法もしくは当業者に公知の他の方法を使用して決定され得る。これらの重複配列は、さらなるFhmアナログを生じる保存的アミノ酸置換および非保存的アミノ酸置換についての指針を提供する。これらのアミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸からなってもよいし、もしくは天然に存在しないア

ミノ酸からなってもよいことが、理解される。例えば、図1に示されるように、これらのリガンドのB/B'ループとD/Eループとの整列は、可能なFhmアナログが、153位のVal残基がIle、Met、Leu、Phe、Alaまたはノルロイシン残基で置換され得、147位のTyr残基が置換され得、あるいは、154位のPhe残基がLeu、Val、Ile、AlaまたはTyr残基で置換され得ることを示す。さらに、151位のSer残基は、Thr、Ala、またはCysで置換され得、145位のGly残基はProもしくはAlaで置換され得、そして150位のTyrは、Trp、Phe、ThrもしくはSerで置換され得る。

【0189】

本発明のFhm融合ポリペプチドは、1つ以上の異種ペプチドもしくはタンパク質に融合された、Fhmポリペプチド、フラグメント、改変体もしくは誘導体を含む。異種ペプチドおよびタンパク質としては、Fhm融合ポリペプチドの検出および/もしくは単離を可能にするエピトープ、膜貫通レセプタータンパク質もしくはその部分(例えば、細胞外ドメイン)、または膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドもしくはその部分、触媒活性な酵素もしくはその部分、オリゴマー化を促進するタンパク質もしくはペプチド(例えば、ロイシンジッパードメイン)および安定性を増大させるタンパク質もしくはペプチド(例えば、免疫グロブリン定常領域)が挙げられるが、これらに限定されない。Fhmポリペプチドは、それ自体またはそのフラグメント、改変体もしくは誘導体に融合され得る。融合は、Fhmポリペプチドのアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかでなされ得、そしてリンカーまたはアダプター分子なしで直接であり得るし、あるいはリンカーまたはアダプター分子(例えば、1つ以上のアミノ酸残基~約20アミノ酸残基まで、もしくは約50アミノ酸残基まで)を介してであり得る。あるいは、そのFhm融合タンパク質は、1つもしくは2つのTNFリガンドポリペプチド、またはTNFリガンドファミリーのメンバーもしくはサイトカインレセプター(例えば、インターロイキン-1(IL-1)ポリペプチド)に共有結合した、1つもしくは2つのFhmポリペプチドを含み得る。このリガンドは、好ましくは、組換えDNA技術を使用して、融合タンパク質として産生

される。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合部分の分離およびその後のフォールディングを可能にするように、DNA制限エンドヌクレアーゼについての切断部位もしくはタンパク質分解切断についての切断部位を含んで設計される。

【0190】

また、Fhmポリペプチドの循環的に入れ換えられた(circularly permuted)構造アナログが、本発明の一部として想像される。

【0191】

組換えDNA方法の開発により、タンパク質のフォールディング、構造および機能に対する配列転位の効果を研究することが可能になった。新規な配列を作製する際に使用されるアプローチは、そのアミノ酸配列の線形再構成(linear reorganization)による関連するタンパク質の天然に存在する対のアプローチと類似する(Cunninghamら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:3218~3222、1979; TeatherおよびErffle、J. Bacteriol. 172:3837-3841、1990; Schimmingら、Eur. J. Biochem. 204:13-19、1992; YamiuchiおよびMinamikawa、FEBS Lett 260:127-130、1991; MacGregorら、FEBS Lett. 378:263~266、1996)。この型の再構成をタンパク質に初めてインビトロで適用したことが、GoidenbergおよびCreighton(J. Mol. Biol. 165:407~413、1983)により記載された。新規なN末端が、もとの配列の内部部位(区切り点(breakpoint))に選択され、その新規な配列は、もとのC末端もしくはその付近にあるアミノ酸に到達するまで、その区切り点からもと同じアミノ酸順序を有する。この点で、新規な配列は、直接にかもしくはさらなる配列部分(リンカー)を介してのいずれかで、もとのN末端もしくはその付近にあるアミノ酸に結合され、そしてその新規な配列は、もとの配列の区切り部位のN末端側にあったアミノ酸もしくはその付近点に到達するまで、もと同じ配列が続き、この残基はその鎖の新規なC末端を形成する。

【0192】

このアプローチは、58～462アミノ酸のサイズ範囲のタンパク質に適用されている (Goldenberg & Creighton, J. Mol. Biol. 165:407-413, 1983; Li & Coffino, Mol. Cell. Biol. 13:2377-2383, 1993)。試験されたタンパク質は、広範な構造的クラスを表し、これらには、主に α -ヘリックスを含むタンパク質 (インターロイキン-4; Kreitmanら, Cytokine 7:311-318, 1995)、主に β -シートを含むタンパク質 (インターロイキン-1; Horlickら, Protein Eng. 5:427-431, 1992) またはこの2つの混合物を含むタンパク質 (酵母ホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ; Lugerら, Science 243:206-210, 1989) が挙げられる。

【0193】

好ましい実施形態において、Fhmポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体を、ヒトIgGのFc領域に融合させる。1つの例において、当業者に公知の方法を使用して、ヒトIgGのヒンジ、CH2およびCH3領域を、FhmポリペプチドのN末端またはC末端のいずれかに融合させ得る。別の例において、ヒンジ領域の一部ならびにCH2およびCH3領域を、融合し得る。このように産生されたFhm-Fc融合ポリペプチドは、Protein Aアフィニティーカラム (Pierce, Rockford, IL) を用いて精製され得る。さらに、Fc領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、その融合されていない対応物よりも実質的に大きい、インビボでの半減期を示すことが見い出されている。また、Fc領域への融合は、この融合ポリペプチドのダイマー化/マルチマー化を可能にする。このFc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療的品质、循環時間、凝集の減少などのような、特定の質を改善するように変更され得る。

【0194】

Fhmポリペプチド誘導体はまた、本発明の範囲に含まれる。本発明のFhmタンパク質の共有結合改変は、本発明の範囲内に含まれる。改変体Fhmタンパ

ク質は、インビトロ合成によって都合よく調製され得る。このような改変は、精製タンパク質または粗タンパク質の標的アミノ酸残基を、選択した側鎖または末端残基と反応し得る有機誘導体化薬剤と反応させることによって、その分子内に導入され得る。得られた共有結合誘導体は、生物学的活性について重要な残基を同定するためのプログラムにおいて有用である。

【0195】

システイン残基は、最も通常には、 α -ハロアセテート（および対応するアミン）（例えば、クロロ酢酸またはクロロアセトアミド）と反応させて、カルボキシメチル誘導体またはカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイン残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 α -ブromo-（5-イミダゾイル）プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルカリマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリ安息香酸、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

【0196】

ヒスチジン残基は、pH 5.5 ~ 7.0でのジエチルプロカーボネートとの反応によって誘導体化される。なぜなら、この薬剤は、ヒスチジン側鎖に比較的特異的であるからである。p-ブromoフェナシルブロミドもまた有用であり；この反応は、好ましくは、pH 6.0の0.1 Mカコジル酸ナトリウム中で行われる。

【0197】

リジン残基およびアミノ末端残基は、コハク酸無水物またはカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤での誘導体化は、リジン残基の電荷を逆転させる効果を有する。 α -アミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬としては、イミドエステル（例えば、メチルピコリンイミダート）；ピリドキサルホスフェート；ピリドキサル；クロロ水素化ハウ素；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソ尿素；2,4ペンタンジオン；およびトランスアミナーゼ（グリオキシレートとの触媒反応）が挙げられる。

【0198】

アルギニン残基は、1つまたはいくつかの従来の試薬（とりわけ、フェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオンおよびニンヒドリン）との反応によって改変される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高い pK_a に起因して、その反応が、アルカリ条件で行われることを必要とする。さらに、これらの試薬は、リジンの官能基およびアルギニンのアミノ基と反応し得る。

【0199】

チロシン残基の特異的改変は、それ自体、広範に研究されており、特に、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応による、チロシン残基へのスペクトル標識の導入に特に関心が置かれる。最も通常には、N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンが、それぞれ、O-アセチルチロシン種および3-ニトロ誘導体を形成するために使用される。チロシン残基は、 ^{125}I または ^{131}I を使用してヨウ素化され、ラジオイムニアッセイ（上記のクロラミンT法が適切である）における使用のための標識タンパク質を調製する。

【0200】

カルボキシル側鎖基（アスパラギン酸またはグルタミン酸）は、カルボジイミド（ R^1 ）（例えば、1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリニル-（4-エチル）カルボジイミドまたは1-エチル-3（4アゾニア4,4-ジメチルペンチル）カルボジイミド）との反応によって選択的に改変される。さらに、アスパラギン酸残基およびグルタミン酸残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギン酸残基およびグルタミン酸残基に変換される。

【0201】

二官能性薬剤での誘導体化は、Fhmタンパク質/ポリペプチドを、Fhmタンパク質融合ポリペプチドを切断して、切断されたポリペプチドを放出および回収するための方法における使用のための、水不溶性支持体のマトリックスまたは表面に架橋するために有用である。通常使用される架橋剤としては、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)、ホモ二官能性イミドエステル(ジスクシンイミジルエステル(例えば、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート))を含む)および二官能性マレイミド(例えば、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン)が挙げられる。メチル-3-[p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミダートのような誘導体化薬剤は、光の存在下で架橋を形成し得る、光活性化性の中間体を生じる。あるいは、米国特許第3,969,287号;同第3,691,016号;同第4,195,128号;同第4,247,642号;同第4,229,537号;および同第4,330,440号(本明細書中に参考として援用される)に記載される反応性の水不溶性マトリックス(例えば、臭化シアン活性化炭化水素)およびその反応性基質が、タンパク質の固定に使用される。

【0202】

グルタミン残基およびアスパラギン残基は、しばしば、対応するグルタミン酸残基およびアスパラギン酸残基に脱アミド化される。あるいは、これらの残基は、穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれかの形態は、本発明の範囲内である。

【0203】

他の改変としては、プロリンおよびセリンのヒドロキシル化、セリン残基またはスレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 79-86頁, 1983)、N末端アミンのアシル化、およびいくつかの場合において、C末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。このような誘導体は、Fhmポリペプチドがポリマーに連結されている、化学的に改変されたFhmポリペプチド組成物である。選択されるポリマーは、代表的には水溶性であり、その結果、そのポリマーに連結されているタンパク質は、水性環境(例えば、生理学的環境)下で沈殿しない。選択されたポリマーは、通常、単一の反応基(例えば、アシル化のための活性エステルまたはアルキル化のためのアルデヒド)を有するように改変され、その結果、ポリマー化の程度は、本発明の方法に提供される

ように、制御され得る。このポリマーは、任意の分子量であり得、そして分枝されていても分枝されていなくてもよい。ポリマーの混合物が、Fhmポリペプチドポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の調製物の治療的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0204】

ポリマーは、各々、任意の分子量のポリマーであり得、そして分枝しても分枝しなくてもよい。ポリマーは、各々、代表的に、約2kDa~約100kDaの間の平均分子量を有する(用語「約」とは、水溶性ポリマーの調製物において、ある分子は、示された分子量よりも大きく、ある分子は、示された分子量より小さいことを示す)。各ポリマーの平均分子量は、約5kDa~約50kDaの間、より好ましくは、約12kDa~約40kDaの間、そして最も好ましくは、約20kDa~約35kDaの間である。

【0205】

適切な水溶性ポリマーまたはそれらの混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N結合型炭水化物またはO結合型炭水化物、糖類、ホスフェート、炭水化物；糖類；ホスフェート；ポリエチレングリコール(PEG)(モノ-(C1~C10)アルコキシ-またはアリーロキシ-ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用されているPEGの形態を含む)；モノメトキシ-ポリエチレングリコール；デキストラン(例えば、低分子量(例えば、約6kD)のデキストラン)、セルロース；セルロース；他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)およびポリビニルアルコール。配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはFhmポリペプチド改変体の共有結合されたマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【0206】

一般に、化学誘導体化は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用される任意の適切な条件下で行われ得る。ポリペプチドの化学誘導体を調

製するための方法は、一般に、以下の工程を包含する：(a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはFhmポリペプチド改変体が、1以上のポリマー分子に結合されるような条件下で、ポリペプチドを、活性化したポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と反応させる工程、および(b) 反応生成物を得る工程。最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子：タンパク質の比が大きいほど、結合されるポリマー分子の割合は大きくなる。1つの実施形態において、Fhmポリペプチド誘導体は、そのアミノ末端で単一のポリマー分子部分を有し得る（例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと）。

【0207】

本発明における使用に特に好ましい水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（略称、PEG）である。本明細書中で使用される場合、ポリエチレングリコールは、他のタンパク質を誘導体化するために使用されてきた、任意の形態のPEG（例えば、モノ-(C1~C10)アルコキシ-またはアリアルコキシ-ポリエチレングリコール）を含むことが意味される。PEGは、広範な分子量で入手可能な、直鎖状または分枝状の中性のポリエーテルであり、水および多くの有機溶媒に可溶性である。PEGは、水中に存在する場合、他のポリマーまたはペプチドを排除するのに効果的であり、これは、主に、他のタンパク質またはポリマー表面に結合した場合に、水のシェルまたは水和球（hydration sphere）を形成する、その高い動的な鎖可動性および親水性性質による。PEGは、非毒性であり、非免疫原性であり、そして食品医薬庁に承認されている。

【0208】

PEGに結合体化されたタンパク質または酵素は、動物に投与した場合に、生体活性、非抗原性特性およびクリアランス速度の減少を示した。F.M.Veroneseら、Preparation and Properties of Monomethoxypoly(ethylene glyco.)-modified Enzymes for Therapeutic Appli

cations, J. M. Harris 編、Poly (Ethylene Glycol Chemistry - - Biotechnical and Biomedical Applications 127 - 36、1992 (本明細書中に参考として援用される)。これは、免疫系による認識の阻止における、PEGの排除特性に起因する。さらに、PEGは、タンパク質吸着を減少させ、血液適合性を改善するための、表面改変手段に広範に使用されている。S. W. Kimら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 516: 116 - 30 1987 ; Jacobsら、Artif. Organs 12: 500 - 501, 1988 ; Parkら、J. Poly. Sci, Part A 29: 1725 - 31, 1991 (本明細書中で参考として援用される)。疎水性ポリマー表面 (例えば、ポリウレタンおよびポリスチレン) は、PEG (MW 3,400) のグラフティングによって改変され、非トロンボゲン形成性表面として使用されている。これらの研究において、表面特性 (接触角) は、PEGの水和効果に起因して、親水性表面とより一致した。より重要なことに、タンパク質 (アルブミンおよび他の血漿タンパク質) の吸着は、非常に減少され、これは、PEGの高い鎖動性、水和球およびタンパク質排除特性から生じる。

【0209】

PEG (MW 3,400) は、表面固定研究 (Parkら、J. Biomed. Mat. Res. 26: 739 - 45, 1992) において最適なサイズとして決定され、一方、PEG (MW 5,000) は、タンパク質抗原性の減少において最も有利であった (F. M. Veroneseら、J. M. Harris 編、Poly (Ethylene Glycol) Chemistry - - Biotechnical and Biomedical Applications 127 - 36、前出 (本明細書中で参考として援用される))。

【0210】

一般に、化学誘導体化は、生物学的に活性な物質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用される任意の適切な条件下で行われ得る。ペグ (PEG) 化 Fhmポリペプチドを調製するための方法は、一般に以下の工程を包含する：(a) Fhmポリペプチドが、1以上のPEG基に結合されるような条件下でポリペ

プチドをポリエチレングリコール（例えば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と反応させる工程、および（b）反応生成物を得る工程。一般に、アシル化反応に最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、PEG：タンパク質の比が大きいほど、ポリ-ペグ化生成物の割合が高くなる。

【0211】

好ましい実施形態において、Fhmポリペプチド誘導体は、N末端で単一のPEG部分を有する。米国特許第8,234,784号（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

【0212】

一般に、本発明のFhmポリペプチド誘導体の投与によって緩和または調節され得る状態としては、Fhmポリペプチドについて本明細書中で記載される状態が挙げられる。しかし、本明細書中に開示されるFhmポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較して、さらなる活性、増強または減少された生物学的活性、または他の特徴（例えば、増加または減少された半減期）を有し得る。

【0213】

（遺伝子操作した非ヒト動物）

ネイティブFhmポリペプチドをコードする遺伝子が破壊（「ノックアウト」）されて、その結果、この遺伝子の発現レベルが、有意に減少されているかまたは完全に消失されている、非ヒト動物（例えば、マウス、ラットまたは他の齧歯目、ウサギ、ヤギまたはヒツジ、あるいは他の家畜動物）も、本発明にさらに含まれる。このような動物は、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【0214】

本発明はさらに、その動物についてネイティブな形態のFhm遺伝子または異種Fhm遺伝子のいずれかが、その動物によって過剰発現されている（それによって「トランスジェニック」動物が作製される）非ヒト動物（例えば、マウス、ラットまたは他の齧歯目、ウサギ、ヤギまたはヒツジ、あるいは他の家畜動物）を包含する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,7

43号およびPCT出願番号WO94/28122に記載のような、周知の方法を使用して調製され得る。

【0215】

本発明はさらに、本発明の1以上のFhmポリペプチドに対するプロモーターが、活性化または不活性化されて（例えば、相同組換え法を使用することによって）1以上のネイティブFhmポリペプチドの発現レベルが変更されている非ヒト動物を包含する。

【0216】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングに使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物に対する薬物候補の影響が測定され得；例えば、薬物候補は、Fhm遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生されるFhmポリペプチドの量は、薬物候補への動物の曝露後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少する薬物候補の能力または病理学的状態を防止または阻止する能力を試験し得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の産生が、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少する薬物候補の能力または病理学的状態を防止または阻止する能力を試験し得る。

【0217】

（マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイ技術が、本発明に従って利用され得ることは明らかである。DNAマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置された、核酸の微小の高密度アレイである。このアレイ内の各セルまたはエレメントは、単一種のDNAの多くのコピーを有し、このDNAは、その同族のmRNAに対するハイブリダイゼーションのための標的として作用する。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、最初に、mRNAが、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素的に変

換される。この材料を、マイクロアレイにハイブリダイズさせ、そして未結合 cDNA を洗浄により除去する。次いで、アレイ上に提示される別々の遺伝子の発現を、各標的 DNA に特異的に結合された標識 cDNA の量を定量することによって可視化する。このようにして、数千の遺伝子の発現を、生物学的材料の単一のサンプルから、高スループットの並行様式で定量し得る。

【0218】

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

【0219】

(選択的結合因子)

本明細書中で使用される場合、用語「選択的結合因子」とは、1以上の F h m ポリペプチドに対する特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的 F h m ポリペプチド選択的結合因子は、F h m ポリペプチドの特定の部分を結合し得、それによって、F h m ポリペプチドレセプターへの F h m ポリペプチドの結合を阻害する。

【0220】

F h m ポリペプチドを結合する選択的結合因子 (例えば、抗体および抗体フラグメント) は、本発明の範囲内にある。抗体は、ポリクローナル (単一特異的なポリクローナルを含む) 抗体、モノクローナル抗体 (mAb)、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体 (例えば、CDR グラフト化抗体)、ヒト抗体、単鎖抗体および/または二特異性抗体、ならびにそれらのフラグメント、改変体または誘導体であり得る。抗体フラグメントは、F h m ポリペプチドのエピトープに結合

する抗体の部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素的切断によって生成される、FabフラグメントおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術(例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現)によって精製されるフラグメントが挙げられる。

【0221】

Fhmポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、一般に、Fhmおよびアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって、動物(例えば、ウサギまたはマウス)において産生される。Fhmポリペプチドあるいはその改変体、フラグメントまたは誘導体を、キャリアタンパク質に結合体化することが有用であり得、このキャリアタンパク質は、免疫される種において免疫原性である(例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリンまたはダイズトリプシンインヒビター)。また、凝集因子(例えば、ミョウバン)も、免疫応答を増強するために使用される。免疫後、動物を採血し、そして血清を、抗Fhm抗体力価についてアッセイする。

【0222】

Fhmに対するモノクローナル抗体は、培養物中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するための適切な方法の例としては、Kohlerら、Nature 256:495-497、1975のハイブリドーマ法、およびKozbor, J. Immunol. 133:3001、1984; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51~63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)のヒトB細胞ハイブリドーマ法が挙げられる。

【0223】

Fhmポリペプチドと反応性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。

【0224】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤としての使用のために改変され得る。1つの実施形態は、「キメラ」抗体であり、ここで、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と、同一であるかまたは相同であり、鎖の残りの部分は、別の種に由来するかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と、同一であるかまたは相同である。このような抗体のフラグメントもまた、それらが、所望の生物学的活性を示す限り、含まれる(米国特許第4,816,567号; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855、1985(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。

【0225】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である(米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと)。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源由来のそのヒト化抗体に1以上のアミノ酸残基が導入されている。ヒト化は、例えば、齧歯目の相補的決定領域(CDR)の少なくとも一部を、ヒト抗体の対応する領域で置換することによる、当該分野で記載される方法(Jonesら、Nature 321:522-52、1986; Riechmannら、Nature 332:323-327、1988; Verhoevenら、Science 239:1534-1536、1988)によって、行われ得る。

【0226】

Fhmポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体を結合する、完全ヒト抗体もまた、本発明に含まれる。このような抗体は、必要に応じてキャリアに結合体化されたFhm抗原(すなわち、少なくとも6個連続するアミノ酸を有する)で免疫することによって産生される。内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用する。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2551-2555、1993;

Jakobovitsら、Nature 362:255-258、1993；
Bruggemannら、Year in Immuno. 7:33、1993
を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、
免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をその中でコードする内因性遺伝子座を不活化
し、ヒト重鎖および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座を、そのゲノム内に導
入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物（完全未満の
補体の改変を有する）を交雑育種して、所望の免疫系の改変の全てを有する動物
を得る。免疫原を投与した場合、これらのトランスジェニック動物は、これらの
抗原に免疫特異的な可変領域を含む、（例えば、マウスよりもむしろ）ヒトのア
ミノ酸配列を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/059
28およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国
特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US91/245、PCT
/GB89/01207、ならびにEP546073B1およびEP5460
73A1に記載される。ヒト抗体はまた、本明細書中に記載されるような、宿主
細胞における組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞における発現によっ
て産生される。

【0227】

代替的な実施形態において、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー
において生成され得る（Hoogenboomら、J.Mol.Biol.22
7:381、1991；Marksら、J.Mol.Biol.222:581
、1991）。これらのプロセスは、糸状バクテリオファージの表面上での抗体
レパートリーのディスプレイ、引き続いて、選択された抗原に対するそれらの結
合によるファージの選択によって免疫選択を模倣する。1つのこのような技術は
、PCT出願番号PCT/US98/17364（これは、このようなアプロー
チを用いたMPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する高親和性でか
つ機能的アゴニスト抗体の単離を記載する）に記載される。

【0228】

キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、およびヒト化抗体は、代表的には、組換
え方法により生成される。これらの抗体をコードする核酸は、宿主細胞に導入さ

れ、そして本明細書中に記載される材料および方法を用いて発現される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）において発現される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、宿主細胞における組換えDNAの発現によるか、または本明細書中に記載のハイブリドーマ細胞における発現により生成され得る。

【0229】

本発明の抗Fhm抗体は、Fhmポリペプチドの検出および定量について、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的サンドイッチアッセイおよび間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ（Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）において用いられ得る。抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性でFhmポリペプチドを結合する。

【0230】

診断適用に関しては、特定の実施形態において、抗Fhm抗体は、代表的には検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを生じ得る任意の部分である。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S または ^{125}I ）、蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミンもしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る。Bayerら, *Meth. Enz.* 184: 138-163, 1990を参照のこと。

【0231】

本発明の抗Fhm抗体は、Fhmポリペプチドの検出および定量について、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的サンドイッチアッセイおよび間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ（Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc.,

1987))において用いられ得る。この抗体は、使用されるアッセイ方法について適切な親和性でF h mポリペプチドを結合する。

【0232】

次いで、細胞溶解物または精製F h mタンパク質改変体の活性は、所望の特徴についての適切なスクリーニングアッセイにおいてスクリーニングされる。例えば、リガンドに対する結合親和性またはF h mタンパク質の免疫学的特徴（例えば、所定の抗体に対する親和性）の変化は、競合型のイムノアッセイにより測定される。免疫調節活性の変化は、適切なアッセイによって測定される。このようなタンパク質特性の改変は、酸化還元または熱安定性、疎水性、タンパク質分解に対する感受性またはキャリアとの凝集傾向またはマルチマーへの凝集傾向として、当業者に周知の方法によりアッセイされる。競合結合アッセイは、限定された量の抗体との結合について試験サンプル分析物（F h mポリペプチド）と競合する標識された標準物質（例えば、F h mポリペプチドまたはその免疫学的に反応性の部分）の能力に依存する。試験サンプル中のF h mポリペプチドの量は、この抗体に結合する標準物質の量に逆比例する。結合する標準物質の測定を容易にするために、この抗体は、代表的には、競合の前または後に不溶化され、その結果、この抗体に結合する標準物質および分析物は、結合しないままの標準物質および分析物から簡単に分離され得る。

【0233】

サンドイッチイムノアッセイは、代表的には、2つの抗体（各々、検出され、そして/または定量されるタンパク質の異なる免疫原性部分、エピトープに結合し得る）の使用に関する。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル分析物は、代表的には、固体支持体に固定化された第1の抗体、その後第2の抗体が分析物に結合し、このようにして不溶性の3部分で構成される複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体検出可能な部分で標識され得るか（例えば、直接サンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定され得る（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）であり、この場合、この検

出可能な部分は酵素である。

【0234】

選択的結合因子（抗Fhm抗体を含む）はまた、インビボ画像化のために有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物に（好ましくは、血流に）投与され得、そして宿主における標識化抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、動物において（核磁気共鳴、放射線学または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかで）検出可能な任意の部分で標識され得る。

【0235】

選択的結合因子（本発明の抗体を含む）は、治療剤として使用され得る。これらの治療的抗体は、一般に、それらがFhmポリペプチドの生物学的活性の少なくとも1つを増強または減少するかのいずれかであるという点で、それぞれ、アゴニストまたはアンタゴニストである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、Fhmポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体に特異的に結合し得、そしてFhmポリペプチドの機能的活性をインビボまたはインビトロで阻害または排除し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、アンタゴニスト抗体は、Fhmポリペプチドの機能的活性を少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは90%、そして最も好ましくは100%阻害する。別の実施形態において、この選択的結合因子は、Fhm結合パートナー（例えば、レセプター）と相互作用し、それによりインビトロまたはインビボでFhm活性を阻害または排除し得る抗体であり得る。選択的結合因子（アゴニスト抗Fhm抗体およびアンタゴニスト抗Fhm抗体を含む）は、当該分野で周知のスクリーニングアッセイにより同定される。

【0236】

本発明はまた、Fhm選択的結合因子（例えば、抗体）および生物学的サンプルにおいてFhmポリペプチドレベルを検出するに有用な他の試薬を含むキットに関する。このような試薬としては、以下が挙げられ得る：検出可能な標識、ブロッキング血清、陽性コントロールサンプルおよび陰性コントロールサンプル、ならびに検出試薬。

【0237】

本発明のFhmポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを用いて、Fhmレセプターをクローニングするために使用され得る。放射性標識(¹²⁵ヨウ素)Fhmポリペプチドまたは親和性/活性タグ化Fhmポリペプチド(例えば、Fc部分またはアルカリホスファターゼの融合物)を結合アッセイに用いて、Fhmレセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離されたRNAは、cDNAに変換され、哺乳動物発現ベクターにクローニングされ、そして哺乳動物細胞(例えば、COS細胞または293細胞)にトランスフェクトされて、発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射性標識されたか、またはタグ化されたFhmポリペプチドは、親和性リガンドとして用いられて、このライブラリーから細胞の表面でFhmレセプターを発現する細胞のサブセットが同定および単離され得る。次いで、これらの細胞からDNAが単離され、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトされて、第2の発現ライブラリーが作製され得る。この第2の発現ライブラリーにおいて、Fhmレセプターを発現する細胞の割合は、最初のライブラリーの数倍高い。この富化プロセスは、Fhmレセプターを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、繰り返し反復され得る。Fhmレセプターの単離は、Fhmポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性Fhmレセプター、抗Fhmレセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、そしてそれらは、1つ以上の疾患または障害(本明細書中に記載のものを含む)を処置、予防または診断するために用いられ得る。

【0238】

(診断キットおよび試薬)

本発明は、レセプターおよび/または抗体の存在を検出するための種々の診断キットおよび方法におけるFhmタンパク質、そのフラグメント、ペプチド、結合組成物、ならびにその融合産物の使用を企図する。代表的には、このキットは、Fhmペプチドもしくは遺伝子セグメント、またはその一方もしくは他方を認

識する試薬（例えば、結合試薬）を含む区画を有する。

【0239】

F h mに対する結合パートナーまたは試験化合物の結合親和性を決定するためのキットは、代表的には、結合パートナー試験化合物；標識化合物（例えば、このタンパク質に対する公知の結合親和性を有する抗体）；または結合パートナーの供給源（天然に存在するか、または組換え）、および結合した標識化合物から遊離の標識化合物を分離するための手段（例えば、リガンドもしくはその結合パートナーを固定化するための固相）を含む。一旦化合物がスクリーニングされると、リガンドまたはその結合パートナーに対する適切な結合親和性を有する化合物を適切な生物学的アッセイ（当該分野で周知）において評価して、これらの化合物がF h m活性のアゴニストまたはアンタゴニストとして働き得るか否かを決定し得る。組換えF h mおよび/またはレセプターポリペプチドの利用可能性はまた、このようなアッセイを較正するためのまたは陽性コントロールサンプルとしての十分に規定された標準物質を提供する。

【0240】

例えば、サンプル中のF h mリガンドおよび/またはそのコグネイト結合パートナーの濃度を決定するための好ましいキットは、代表的には、標的に対する公知の結合親和性を有する標識化合物（例えば、抗体）、リガンドまたはレセプターの供給源（天然に存在するか、または組換え）、および結合した標識化合物を遊離の標識化合物から分離するための手段（例えば、リガンドまたはレセプターを固定化するための固相）を含む。通常、試薬、および使用または廃棄のための説明書を含む区画が提供される。

【0241】

抗体（リガンドまたはレセプターに特異的な抗原結合フラグメントを含む）またはフラグメントは、リガンド、レセプターおよび/またはそのフラグメントの上昇したレベルの存在を検出するための診断適用において有用である。このような診断アッセイは、溶解物、生細胞、固定細胞、免疫蛍光、細胞培養物、体液を使用し得、そしてさらに、血清などにおいてリガンドまたはレセプターに関連する抗原の検出を含む。診断アッセイは、均質系（遊離の試薬と抗原複合体との間

の分離工程が必要ない)であっても、不均質系(分離工程を必要とする)であってもよい。種々の市販のアッセイが存在し、これらとしては、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、酵素複合イムノアッセイ技術(enzyme-multiplied immunoassay technique)(EMIT)、基質標識蛍光イムノアッセイ(SLFIA)などが挙げられる。例えば、非標識抗体は、標識され、かつリガンドもしくはレセプターもしくはその特定のフラグメントに対する1次抗体を認識する二次抗体を用いることにより使用され得る。類似のアッセイはまた、文献中で広範に議論されている(例えば、Harlow and Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと)。

【0242】

抗イディオタイプ抗体は、リガンドまたはレセプターに対する抗体の存在を診断するために類似の用途を有し得、このようにして種々の異常状態を診断し得る。例えば、リガンドまたはレセプターの過剰生成は、異常な生理的状态(特に種々の炎症状態またはアレルギー状態において)の診断であり得る種々の免疫学的反応の生成を生じ得る。

【0243】

頻繁には、診断アッセイについての試薬は、アッセイの感度を最適化するためにキット中で供給される。本発明に関しては、アッセイの性質、プロトコル、および標識、標識抗体もしくは非標識抗体のいずれかまたは標識リガンドもしくはレセプターに依存して、提供される。これは、通常、他の付加物(例えば、緩衝液、安定化剤、シグナル生成に必要な材料(例えば、酵素の基質など))と関連している。好ましくは、キットは、適正な使用および使用後の内容物の廃棄についての説明書もまた含む。代表的には、このキットは、各有用な試薬のための区画または容器を有する。望ましくは、この試薬は、凍結乾燥粉末として提供され、ここで、この試薬は、このアッセイを実行するための試薬の適切な濃度を提供する水性媒体中で再構成され得る。

【0244】

薬物スクリーニングおよび診断アッセイの前述の構成成分は、改変されずに使用されてもよいし、種々の方法で改変されても良い。例えば、標識化は、直接的または間接的に検出可能なシグナルを提供する部分を共有結合または非共有結合することにより達成され得る。これらのアッセイのいずれにおいても、リガンド、試験化合物、レセプター、またはそれらに対する抗体は、直接的または間接的にかのいずれかで標識され得る。直接標識化の可能性としては、以下の標識群が挙げられる：放射性標識（例えば、 ^{125}I ）、ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼのような酵素（米国特許第3,645,090号）、および蛍光強度の変化、波長シフトまたは蛍光分極をモニターし得る蛍光標識（米国特許第3,940,475号）。間接標識化の可能性としては、以下が挙げられる：1つの成分のビオチン化に続き、上記の標識基の1つに結合したアビジンへの結合。

【0245】

結合リガンドを遊離リガンドから分離する方法、あるいは結合試験化合物から遊離試験化合物を分離する方法もまた多数存在する。このリガンドまたはレセプターは、おそらく界面活性剤または関連する脂質とともに、種々のマトリックスに固定化され得、続いて洗浄され得る。適切なマトリックスとしては、ELISAプレート、フィルター、およびビーズのようなプラスチックが挙げられる。リガンドまたはレセプターをマトリックスに固定化する方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：プラスチックへの直接接着、捕捉抗体の使用、化学的カップリング、およびビオチン-アビジン。このアプローチの最後の工程は、いくつかの方法（例えば、ポリエチレングリコールのような有機溶媒または硫酸アンモニウムのような塩を利用する方法を含む）のいずれかにより抗原/抗体複合体の沈降を含み得る。他の適切な分離技術としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Rattleら、Clin. Chem., 30:1457-1461, 1984に記載される蛍光抗体磁性可能粒子法、および米国特許第4,659,6178号（本明細書中に参考として援用される）に記載される二重磁性粒子分離。

【0246】

タンパク質またはそれらのフラグメントを種々の標識に連結するための方法は、文献中に広範に報告されており、本明細書中で詳細に議論する必要はない。この技術の多くは、ペプチド結合を形成するためのカルボジイミドまたは活性エステルの使用、メルカプト基と活性化ハロゲン（例えば、クロロアセチル）との反応によるチオエステルの形成、活性化オレフィン（例えば、マレイミド）、連結などのいずれかによる活性化カルボキシル基の使用を含む。融合タンパク質はまた、これらの適用における使用を見出す。

【0247】

本発明の核酸分子は、染色体に対するFhm遺伝子または関連遺伝子の位置をマッピングするために使用され得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、PCR増幅、インサイチュハイブリダイゼーション、およびFISH）により行われ得る。

【0248】

本発明はまた、変異したFhm遺伝子の存在に関連した疾患またはこの疾患に対する感受性を検出するための診断アッセイの一部としてのFhm遺伝子の使用に関する。このような疾患は、Fhmの異常な発現（例えば、腫瘍および癌のような異常な細胞増殖）に関する。

【0249】

ヒトFhm遺伝子において変異を有する固体は、種々の技術によりDNAレベルで検出され得る。診断のための核酸は、例えば、血液、尿、唾液、組織生検および剖検材料のような患者の細胞から得られ得る。ゲノムDNAを検出のために直接用いてもよいし、分析前にPCRを用いて酵素的に増幅してもよい（Saiikiら, Nature, 324:163-166, 1986）。RNAまたはcDNAはまた、同じ目的で使用され得る。例として、Fhmポリペプチドをコードする核酸に相補的なPCRプライマーは、Fhm変異を同定および分析するために用いられ得る。例えば、欠失および挿入は、正常遺伝子型と比較して、増幅産物のサイズの変化により検出され得る。点変異は、増幅したDNAを、放射性標識したFhm RNAあるいは放射性標識したFhmアンチセンスDNA配列

にハイブリダイズすることにより同定され得る。完全に適合した配列は、RNase A消化によるか、または融解温度の差異により不一致二重鎖から区別され得る。

【0250】

DNA配列差異に基づく遺伝子試験は、変性剤を伴っても伴わなくても、ゲル中のDNAフラグメントの電気泳動移動度の変化の検出により達成され得る。小さな配列欠失および挿入は、高分解能ゲル電気泳動により可視化され得る。異なる配列のDNAフラグメントは、変性したホルムアミド勾配ゲル上でのフラグメントに対して区別され得る。ここで、異なるDNAフラグメントの移動度は、それらの特異的融解温度または部分的融解温度に従って異なる位置でゲル中で妨害される（例えば、Myersら, Science, 230:1242, 1985）。

【0251】

特異的位置での配列変化はまた、ヌクレアーゼ保護アッセイ（例えば、RNaseおよびS1保護）または化学的切断方法により明らかにされ得る（例えば、Cottonら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:4397-4401, 1985）。

【0252】

従って、特異的DNA配列の検出は、ハイブリダイゼーション、RNase保護、化学的切断、直接DNA配列決定または制限酵素の使用（例えば、制限フラグメント長多型（RFLP））およびゲノムDNAのサザンブロットティングのような方法により達成され得る。

【0253】

より多くの従来のゲル電気泳動およびDNA配列決定に加えて、変異はまた、インサイチュ分析により検出され得る。

【0254】

本発明はまた、種々の組織におけるFhmタンパク質の変化したレベルを検出するための診断アッセイに関する。なぜなら、正常コントロール組織サンプルと比較して、タンパク質の過剰発現は、疾患（例えば、腫瘍、脳マラリアおよび遺

伝性周期熱症候群)の存在または疾患に対する感受性を検出し得るからである。宿主から得られたサンプル中のFhmタンパク質のレベルを検出するために用いられるアッセイは、当業者に周知であり、そして以下が挙げられる：ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェスタンブロット分析、ELISAアッセイおよび「サンドイッチ」アッセイ。ELISAアッセイ(Coliganら, Current Protocols in Immunology, 1(2), Chapter 6, 1991)は、部分的に、Fhm抗原に特異的な抗体(好ましくは、モノクローナル抗体)の調製を包含する。さらに、レポーター抗体が、モノクローナル抗体に対して調製される。検出可能な試薬(例えば、放射活性、蛍光、またはこの例では西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素)がレポーター抗体に結合される。ここでサンプルは、宿主から取り出され、そしてサンプル中のタンパク質を結合する固体支持体(例えば、ポリスチレンディッシュ)上でインキュベートされる。次いで、このディッシュ上の任意のフリーのタンパク質結合部位は、ウシ血清アルブミン(BSA)のような非特異的タンパク質とともにインキュベートすることにより、覆われる。次に、モノクローナル抗体は、ポリスチレンディッシュに結合した任意のFhmタンパク質にモノクローナル抗体が結合する時間の中に、ディッシュ中でインキュベートされる。全ての非結合モノクローナル抗体は、緩衝液で洗い流される。西洋ワサビペルオキシダーゼに連結したレポーター抗体は、ここでディッシュに入れられ、Fhmに結合した任意のモノクローナル抗体に対するレポーター抗体の結合を生じる。次いで、結合していないレポーター抗体は、洗い流される。次いで、ペルオキシダーゼ基質がディッシュに添加され、そして所定の時間で発色した呈色の量は、標準曲線に対して比較した場合、所定の用量の患者サンプル中に存在するFhmタンパク質の量の測定値である。

【0255】

競合アッセイが用いられ得、ここで、Fhmに特異的な抗体は、固体支持体に結合され、そして標識されたFhmおよび宿主由来のサンプルが、固体支持体に対して分配され、そして検出された標識の量(例えば、液体シンチレーションクロマトグラフィーによる)は、サンプル中のFhmの量と相関され得る。さらに

、上記のサンドイッチイムノアッセイはまた、生物学的サンプル中のFhmの量を定量するために行われ得る。

【0256】

本発明の配列は、染色体同定およびマッピングについて評価可能である。この配列は、個々のヒト染色体上の特定位置に特異的に標的化され得、そしてこの位置とハイブリダイズし得る。さらに、遺伝子が位置し得る染色体上での特定の部位を同定することが現在必要である。実際の配列データ（反復多型）に基づく染色体マーキング試薬は、染色体位置をマーキングするには現在ほとんど利用可能ではない。本発明に従う染色体に対するDNAのマッピングは、配列と、疾患と関連する遺伝子とを相関させることにおいて重要な第一の工程である。

【0257】

簡潔には、配列は、cDNAからPCRプライマー（好ましくは、15～25bp）を調製することにより染色体にマッピングされ得る。この配列の3'非翻訳領域のコンピューター分析は、ゲノムDNA中の1つのエクソンを超えてまたがらない、従って、増幅プロセスを複雑にするプライマーを迅速に選択するために用いられる。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために用いられる。このプライマーに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが増幅フラグメントを生じる。

【0258】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定の染色体に特定のDNAを割り当てるための迅速な手順である。同じオリゴヌクレオチドプライマーとともに本発明を用いると、同様な様式で、特定の染色体またはより大きなゲノムクロームのプールからフラグメントのパネルを用いて下位の位置決定が達成され得る。その染色体に対してFhmをマッピングするために同様に用いられ得る他のマッピングストラテジーとしては、以下が挙げられる：インサイチュハイブリダイゼーション、フローソーティングされて標識された（labeled flow-sorted）染色体での予備スクリーニングおよび染色体特異的cDNAライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる予備選択。

【0259】

cDNAクローンの中期染色体スプレッドへの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)を用いて、一工程で正確な染色体位置を提供し得る。この技術は、500または600塩基程度の長さのcDNAとともに使用され得る；しかし、2,000bpより大きなクローンは、簡単な検出のために十分なシグナル強度で独特の染色体位置に結合するという尤度がより高い。FISHは、ゲノムクローンまたは発現配列タグ(EST)が由来するクローンの使用を必要とし、そして大きくなるほど、良好になる。例えば、2,000bpは好ましく、4,000bpはより好ましく、そして4,000を超えるものは、妥当な割合の時間で良好な結果を得るためにはおそらく必要でない。この技術の総説については、Vermaら, Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)を参照のこと。

【0260】

一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体に対する配列の物理的位置は遺伝子マップデータと相関され得る。このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通じてオンラインで利用可能)において見出され得る。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との関連は、連鎖分析(物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝)を通じて同定される。

【0261】

次に、罹患個体と非罹患個体との間のcDNA配列またはゲノム配列における差異を決定することが必要である。変異が罹患個体のいくらかまたは全てにおいて観察されたが、いずれの正常個体においても観察されなかった場合、この変異は、疾患の原因因子である可能性が高い。

【0262】

物理的マッピングおよび遺伝子マッピング技術の現在の分解能では、疾患と関連した染色体領域に正確に位置決定されたcDNAは、50と500の潜在的原因遺伝子のうち1つであり得る(これは、1メガ塩基マッピング分解能および2

0 kbにつき1遺伝子と推定される)。

【0263】

本発明の核酸分子はまた、Fhm発現のアンチセンスインヒビターとして有用である。このような阻害は、発現制御配列(三重ヘリックス形成)またはFhm mRNAに相補的であり、かつこれにハイブリダイズする核酸分子によりもたらされ得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されたFhmの配列を用いて利用可能な技術により設計され得る。アンチセンスインヒビターは、細胞または器官中のFhmポリペプチドの減少または非存在に関する情報を提供する。

【0264】

本発明の核酸分子は、遺伝子治療のために使用され得る。Fhmをインビボで発現する核酸分子は、細胞または生物においてそのポリペプチドの効果に関連する情報を提供する。Fhm核酸分子、フラグメントおよび/または誘導体であって、それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしないものは、哺乳動物組織または体液のサンプルにおいて、Fhm DNAまたは対応するRNAの存在について、定性的であれ定量的であれ、試験するための診断アッセイにおいてハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0265】

Fhmポリペプチドフラグメント、改変体および/または誘導体は、生物学的に活性であってもそうでなくても、Fhmポリペプチドに結合する抗体を調製するために有用である。この抗体は、インビボおよびインビトロの診断目的のために有用であり得る(例えば、体液または細胞サンプルにおいてFhmポリペプチドの存在を検出するために標識された形態で)。この抗体は、Fhmポリペプチドの少なくとも1つの活性特性を減少またはブロックするようにFhmポリペプチドに結合し得るか、または活性を増加させるようにポリペプチドに結合し得る。

【0266】

(Fhmポリペプチド活性のモジュレーターについてのアッセイ)

いくつかの状況において、Fhmポリペプチドの活性のモジュレーターである

分子（すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト）を同定することが所望され得る。Fhmポリペプチドを調節する天然または合成の分子は、1つ以上のスクリーニングアッセイ（例えば、本明細書において記載されるようなもの）を用いて同定され得る。そのような分子は、インビボもしくはエキソビボでのいずれかの様式でか、または局所もしくは静脈内（iv）注射によってインビボ様式で、または経口送達、移植デバイスなどにより、投与され得る。

【0267】

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

【0268】

Fhmレセプターポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明に包含される。特定の実施形態において、Fhmレセプターポリペプチドは、試験分子と、その試験分子がそのレセプターポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で、生活性のFhmの存在下または非存在下で、インキュベートされ、そしてその相互作用の程度が測定され得る。この試験分子は、実質的に精製された形態で、または粗混合物中でスクリーニングされ得る。

【0269】

特定の実施形態において、Fhmポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子であって、Fhmポリペプチドと相互作用してその活性を調節するものであり得る。Fhmポリペプチド発現を調節する分子としては、Fhmポリペプチドをコードする核酸に相補的であるか、またはFhmポリペプチドの発現を指向または制御する核

酸配列に相補的であり、そして発現のアンチセンスレギュレーターとして作用する核酸が挙げられる。

【0270】

試験分子と、推定Fhmレセプターポリペプチドとの、Fhmリガンドの存在下または非存在下での相互作用の測定は、いくつかの形式で行われ得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイおよび免疫アッセイが含まれる。一般的に、試験分子は、特定時間にわたり、推定Fhmレセプターポリペプチドとインキュベートされ、そしてFhmポリペプチド活性は、生物学的活性を測定する1つ以上のアッセイにより決定される。

【0271】

試験分子とFhmポリペプチドとの相互作用はまた、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて直接アッセイされ得る。あるいは、本明細書に記載されるようなエピトープタグを含む、改変された形態のFhmポリペプチドは、免疫アッセイにおいて使用され得る。

【0272】

放射能についての均質アッセイ技術(SPA; Amersham)および時間解像蛍光(HTRF; Packard)もまた、実施され得る。結合は、放射性同位体(^{125}I 、 ^{35}S 、 ^3H)、蛍光色素(フルオレセイン)、ランタニド(例えば、ユーロピウム(Eu^{3+})キレートまたはクリプテート、オリビピリジル-ルテニウム(Ru^{2+})錯体で標識することによって検出され得る。標識されたプローブの選択は、使用される検出系に依存することが理解される。あるいは、Fhmまたは推定Fhmのアゴニストもしくはアンタゴニストは、標識されていないエピトープタグ(例えば、ビオチン、ペプチド、His6、myc、Fc)で改変され得、ストレプトアビジン、抗ペプチドまたは抗タンパク質抗体であって、上記のような検出標識を有するものに結合され得る。

【0273】

試験分子の推定Fhmレセプターポリペプチドの結合もまた、免疫アッセイにおいてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて直接アッセイされ得る。あるいは、上記のようなエピトープタグを含む、改変形態の推定Fhmレ

セプターポリペプチドは、溶液中でおよび免疫アッセイにおいて使用され得る。

【0274】

1つの実施形態において、Fhmリガンドのモジュレーターは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子であり得る。Fhmの可能なタンパク質アンタゴニストとしては、そのポリペプチドの活性領域に結合し、そしてFhmのその推定レセプターへの結合を阻害または除去する抗体が挙げられる。Fhmポリペプチド発現を調節する分子は、Fhmポリペプチドをコードする核酸に相補的である、またはポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列に相補的であり、発現のアンチセンスレギュレーターとして作用する核酸が挙げられ得る。

【0275】

Fhmポリペプチドが結合パートナー（例えば、レセプター）との相互作用を介して生物学的活性を提示する事象において、種々のインビトロアッセイを使用して、Fhmポリペプチドの対応する結合パートナー（例えば、選択結合因子またはリガンド）への結合を測定し得る。これらのアッセイを使用して、試験分子を、それらがFhmポリペプチドのその結合パートナーへの結合の速度および/または程度を増加もしくは減少させる能力について、スクリーニングし得る。1つのアッセイにおいて、Fhmポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中に固定される。次いで、放射標識されたFhm結合パートナー（例えば、ヨード化Fhm結合パートナー）および試験分子は、1回にいずれか一方を（いずれの順番でも）または同時にそのウェルに加えることができる。インキュベーション後、そのウェルを洗浄し得、そして放射能について計数して（シンチレーションカウンターを用いて）その結合パートナーがFhmポリペプチドへ結合した結合の程度を決定し得る。代表的に、その分子は、ある範囲の濃度にわたって試験され得、そしてその試験アッセイの1つ以上の要素を欠く一連のコントロールウェルを、その結果の評価における精確さのために使用し得る。この方法の代替としては、そのタンパク質の「位置」を反転させること（すなわち、Fhm結合パートナーを、マイクロタイタープレートウェルに固定すること）、その試験分子および評者標識されたFhmとインキュベートすること、ならびにFhm

結合の程度を決定すること(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, New York, NY, 1995の第18章を参照のこと)が含まれる。

【0276】

放射標識の代替として、Fhmポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、次いでビオチン化タンパク質の存在は、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)もしくはアルカリホスファターゼ(AP))に結合したストレプトアビジン(これは、比色測定で検出され得る)またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって、検出され得る。FhmポリペプチドまたはFhm結合体パートナーに対して指向され、そしてビオチンと結合体化された抗体もまた使用され得、そしてAPまたはHRPに結合した酵素結合ストレプトアビジンとのインキュベーション後に、検出され得る。

【0277】

FhmポリペプチドおよびFhm結合パートナーもまた、アガロースビーズ、アクリルビーズまたは他の型のそのような不活性固相基体への付着によって固定され得る。この基体-タンパク質複合体は、その相補タンパク質およびその試験化合物を含む溶液中に配置され得る。インキュベーション後、そのビーズは、遠心分離によって沈降され得、そしてFhmポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合量を上記の方法を用いて検討し得る。あるいは、その基体-タンパク質複合体は、カラムに固定され得、そしてその試験分子および相補タンパク質は、そのカラムを通過させられ得る。次いで、Fhmポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成は、本明細書において記載される技術(すなわち、評者標識、抗体結合など)のいずれかを用いて検討され得る。

【0278】

別のインビトロアッセイであって、Fhm結合タンパク質と結合パートナーとの複合体の形成を増加または減少する試験分子を同定するために有用であるアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器系(例えば、BIAcoreアッセイ系(Pharmacia, Piscataway, NJ))である。BIAcore系は

、製造業者のプロトコルを用いて実施され得る。このアッセイは、本質的に、FhmまたはFhm結合パートナーのいずれかを、デキストランコーティングされたセンサーチップであって、検出器に配置されているものへの共有結合を包含する。

【0279】

次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質は、同時または連続的のいずれかでそのセンサーチップを含むチャンバーへと注射され得る。相補タンパク質の結合量は、そのチップのデキストランコーティングされた側と物理的に結合した分子量の変化に基づいて評価され得、分子量における変化は、その検出器系によって測定され得る。

【0280】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、それらがFhmポリペプチドとFhm結合パートナー複合体との複合体の形成を増加または減少する能力について、評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書において記載されたアッセイは、そのようなさらなる試験化合物を、第一の試験化合物と同時またはその後のいずれかで加えることによって、容易に改変され得る。このアッセイにおける残りの工程は、本明細書において記載されるとおりである。

【0281】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書に記載されるようなアッセイ）は、FhmおよびFhm結合パートナーによる複合体形成に対する効果について、大多数の化合物を迅速にスクリーニングするために有利に使用され得る。このアッセイは、ファージディスプレイにおいて生成された化合物、合成ペプチドおよび化学合成ライブラリーをスクリーニングするように自動化され得る。

【0282】

FhmポリペプチドとFhm結合パートナーとの複合体の形成を増加または減少させる化合物もまた、FhmまたはFhm結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を用いて細胞培養物中においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から入手され得るが、好ましくは、ヒトまた

は他の霊長類、イヌ、または齧歯類起源由来であり得る。F h mポリペプチドの、表面にF h m結合パートナーを発現する細胞への結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度は、例えば、F h m結合パートナーへのビオチン化抗体を用いたフローサイトメトリーにより決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて陽性と評価される化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0283】

細胞培養物は薬物候補の効果をスクリーニングするために用いられ得る。例えば、薬物候補は、F h m遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生されるF h mポリペプチドの量は、その細胞培養物をその薬物候補へ暴露した後に測定され得る。特定の実施形態において、その細胞培養物に対する実際の効果が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、その細胞培養物に対して特定の効果を有し得る。そのような場合、薬物候補がその遺伝子の発現を増加または減少する能力、あるいはそれがその細胞培養物に対する特定の効果を妨害または阻害する能力が試験され得る。他の実施例において、特定の代謝産物の生成（例えば、ポリペプチドのフラグメント）は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。そのような場合、薬物候補が細胞培養物においてそのような代謝産物の生成を減少する能力が試験され得る。

【0284】

(P38インヒビター)

細胞外刺激と細胞からのE L - 1およびT N F との間へと介在するための新たなアプローチは、シグナル経路に存在するキナーゼの阻害を介したシグナル伝達を遮断することを包含する。一例としては、P - 38の阻害を介したものがある（これはまた、「R K」または「S A P K - 2」とも呼ばれる。Lee et al., Nature, 372:739, 1994）、公知のser / thrキナーゼ（クローンは以下に報告された：Han et al., Biochimica Biophysica Acta, 1265:224-227, 1995）の阻害を介したものがある。P - 38に対する競合結合アッセイにおける効力、およびL P S刺激後の単球からのI L - 1のレベルを減少する同じインヒ

ピターについて、線形関係が示された。単球のLPS刺激後、TNF- α についてのメッセンジャーRNAのレベルは、100倍に増加することが示されたが、TNF- α のタンパク質レベルは、10,000倍増加する。従って、TNFシグナル伝達のかなりの増幅は、翻訳レベルで起こる。p38インヒビターにおける単球のLPS刺激後、TNF- α およびIL-1の両方の翻訳効率に対するp38インヒビターの効果に関する上記の生物学的証拠に加えて、強力な原因および効果の関係が生じる。細胞におけるp38の役割は、いまだ解明中であり、従って、その阻害から得られる炎症疾患または他の疾患状態に関する他の有利な効果が解明され得る。

【0285】

上昇したレベルのTNF および/またはIL-1は、発症、病因に寄与し得、または多数の疾患状態を悪化させ得る。このような疾患状態には以下が含まれるがそれらに限定されない：慢性関節リウマチ；骨関節炎；リウマチ脊椎炎；痛風間接；炎症性腸疾患；成人呼吸窮迫症候群（ARDS）；乾癬；クローン病；アレルギー性鼻炎；潰瘍性腸炎；アナフィラキシー；接触性皮膚炎；喘息；抗ウイルス（TNF 阻害に対して感受性のあるウイルス（HIV-1、HIV-2、HIV-3、サイトメガロウイルス（CMV）、インフルエンザ、アデノウイルスおよびヘルペスウイルス（HSV-1、HSV-2および帯状疱疹ヲ含む））治療；筋変性；悪液質；ライター症候群；II型糖尿病；骨吸収疾患；宿主対移植片反応；虚血性再灌流障害；粥状硬化症；脳外傷；アルツハイマー病；多発性硬化症；脳マラリア；敗血症；敗血ショック；毒性ショック症候群；感染に起因する熱およびミラギア（mylagias）。

【0286】

置換されたイミダゾール、ピロール、ピリジン、ピリミジンなどの化合物は、前炎症性サイトカイン（例えば、IL-1、IL-6、IL-8およびTNF）の阻害によるサイトカイン媒介性疾患の処置における用途について記載されている。サイトカイン媒介性疾患の処置における使用のための置換されたイミダゾールは、以下に記載されている：米国特許第5,593,992号；WO93/14081；WO97/18626；WO96/21452；WO96/2165

4 ; WO 9 6 / 4 0 1 4 3 ; WO 9 7 / 0 5 8 7 8 ; WO 9 7 / 0 5 8 7 8 (これらの各々は、本明細書においてその全体が参考として援用される)。炎症の処置における使用のための置換されたイミダゾールは、米国特許第 3 , 9 2 9 , 8 0 7 号 (これは本明細書においてその全体が参考として援用される) に記載されている。サイトカイン媒介性疾患の処置における使用のための置換されたピロール化合物は、WO 9 8 / 2 2 4 5 7 (これは本明細書においてその全体が参考として援用される) に記載されている。サイトカイン媒介性疾患の処置における使用のための、置換されたピリジン、ピリミジン、ピリミジノン、およびピリダジン化合物は、以下に記載されている : WO 9 8 / 2 4 7 8 0 ; WO 9 8 / 2 4 7 8 2 ; WO 9 9 / 2 4 4 0 4 ; および WO 9 9 / 3 2 4 4 8 (これらの各々は、本明細書においてその全体が参考として援用される)。

【 0 2 8 7 】

(インターナライズするタンパク質)

TATタンパク質配列 (HIV由来) を使用して、細胞膜の脂質二重層成分を標的化することにより、タンパク質を細胞へとインターナライズさせ得る。例えば、以下を参照のこと : Falwell et al. , Proc . Natl . Acad . Sci . , 9 1 : 6 6 4 - 6 6 8 , 1 9 9 4。例えば、HIV TATタンパク質の 1 1 アミノ酸配列 (YGRKKRRQRRR ; 配列番号 2 2) (「タンパク質貫通ドメイン」または「TAT PDT」と称する) は、 - ガラクトシダーゼおよび p 2 7 Kip のような大きな生活性のタンパク質の、細胞質膜および細胞の核膜を横切る送達を媒介することが示されている。以下を参照のこと : Schwarze et al. , Science , 2 8 5 : 1 5 6 9 - 1 5 7 2 , 1 9 9 9 ; および Nagahara et al. , Nature Medicine , 4 : 1 4 4 9 - 1 4 5 2 , 1 9 9 8。Schwarze et al. (Science , 2 8 5 : 1 5 6 9 - 7 2 , 1 9 9 9) は、培養された細胞が、TAT PDTと ガラクトシダーゼとの融合物に暴露されたときに - gal 活性を獲得することを実証した。TAT - gal 融合タンパク質のマウスへの注入は、多数の組織 (肝臓、腎臓、肺、心臓および脳の組織を含む) における gal 発現を生じた。

【0288】

従って、TATタンパク質配列を使用して所望のタンパク質またはポリペプチドを細胞へとインターナライズし得ることが理解される。本発明の状況では、TATタンパク質配列は、Fhmアンタゴニスト（すなわち、抗Fhm選択結合因子または低分子）のような別の分子と融合され得、そして細胞内へと投与されて、Fhm分子の活性を阻害させ得る。所望の場合、上記の手順を用いて細胞へと投与するために、Fhmタンパク質自体またはFhmのペプチドフラグメントもしくは改変された形態をそのようなタンパク質トランスデューサーと融合させ得る。

【0289】

（治療用途）

TNFリガンドファミリーのメンバーは、多数の疾患の媒介に相関づけられている。TNFの多面的な性質および関連するリガンドファミリーメンバーは、特定のポリペプチドが有利であるかまたは有害であるかについての一般化を妨害する。いくつかの場合、TNFおよびサイトカインのTNFリガンドファミリーの他のメンバーの局所的効果は、基質を可動化すること、免疫細胞機能を増強すること、炎症を刺激することによる宿主防御機構を、および癌細胞を殺傷するにおいて改善することは明らかである。しかし、他の場合において、TNFの毒性および関連するサイトカインがショック、組織損傷または異化損傷を媒介することにより疾患を引き起こし得る。TNF離ファミドファミリーのメンバーによって媒介される傷害が、TNFレセプター遺伝子ファミリーまたはTNF様リガンド分子のメンバーの可溶性形態の投与によって処置または改善され得る、多くの疾患が存在する。これらの疾患としては以下が挙げられる：後天性免疫不全症候群（AIDS）、貧血、自己免疫疾患、悪液質、癌、脳マラリア、糖尿病、播種性血管内凝固症（disseminated intravascular coagulopathy）、赤芽球疾患症候群、出血性ショック、肝炎、インスリン抵抗性、ハンセン病、白血病、リンパ腫、髄炎、多発性硬化症、心筋虚血、肥満、移植器官拒絶、慢性関節リウマチ、敗血症ショック症候群、不全、成体呼吸窮迫症候群（ARDS）、結核および多くのウイルス疾患。

【0290】

(F h m組成物および投与)

F h mのポリペプチドの薬学的組成物は、F h mの異常発現から生じる適応症に関しヒトおよび動物の予防的および治療処置のため、またはその適応症の改善または治癒をF h mポリペプチドの投与が生じることを決定する場合、本発明の範囲内である。そのような組成物は、治療有効量のF h mポリペプチドおよび/または結合パートナー、あるいはその治療的活性フラグメント、改変体または誘導体を、薬学的に受容可能な添加物および/またはキャリアと混合されて含み得る。適切な処方物材料または薬学的に受容可能な因子としては、以下が挙げられるがそれらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的アジュバント。代表的には、F h mポリペプチドを含む治療的化合物は、精製されたポリペプチド、フラグメント、改変体または誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤とともに組成物の形態で投与される。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。

【0291】

中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、例示の適切なキャリアである。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的なキャリア、希釈剤および賦形剤は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、pH 7.0 - 8.5のT r i s緩衝剤またはpH 4.0 - 5.5の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。その溶液のpHはまた、種々のpHにおいて、F h mの相対的溶解度に基づいて選択されるべきである。

【0292】

組成物における主要な溶媒は、天然で水性または非水性のいずれかであり得る。さらに、そのビヒクルは、処方物の、pH、容量オスモル濃度、粘性、明澄性

、色、滅菌性、安定性、等張性、崩壊速度、または臭いを改変または維持するための他の処方物材料を含み得る。同様に、その組成物は、F h mタンパク質の放出速度を改変または維持するため、またはF h mタンパク質の吸収もしくは透過を促進するための他の処方物材料を含み得る。

【0293】

F h mポリペプチド組成物を含む組成物は、非経口的に投与され得る。あるいは、その組成物は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与されるとき、本発明における使用のための治療組成物は、発熱物質を含まない、経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能なタンパク質溶液の調製は、p H、等張性、安定性などに相当な注意を払えば、当業者の範囲内である。

【0294】

本発明を実施するために有用なF h mポリペプチド組成物の治療所放物は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990）と、所望の程度の純度を有する選択された組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。

【0295】

受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、レシipientに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、そして以下が挙げられる：リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）；低分子量ポリペプチド；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）；モノサッカリド、ジサッカリ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); ならびに / あるいは非イオン性表面活性化剤 (例えば、Tween、プルロニック (pluronic) またはポリエチレングリコール (PEG))。

【0296】

治療的に用いられる有効量の F h m ポリペプチド組成物は、例えば、治療目的 (例えば、組成物が用いられる適応症、投与経路 (例えば、局所投与されるかまたは全身投与されるか)、および患者の状態 (例えば、患者の一般的健康状態、アナウレウエシス (anaureuesis)、年齢、体重、性別)) に依存する。治療有効用量を決定する場合、この疾患の原因である F h m または T N F ファミリーの他のメンバーの量を考慮することが必須である。基本的に、サイトカイン (例えば、F h m) の過剰発現によって誘発される疾患の有効な処置のためには、少なくとも同じモル量の F h m ポリペプチドが必要とされ、そしておそらく複数過剰が必要とされ得るが、レセプターの性質および F h m とのその相互作用の性質に依存してより少ないことが必要とされ得ることが仮定され得る。従って、治療者は、最適の治療効果を得るために必要に応じて、投薬量を力価測定することおよび / または投与経路をインビボで改変することが必要である。代表的な日投薬量は、上記の因子に依存して約 $0.1 \text{ mg / kg} \sim 100 \text{ mg / kg}$ 以上の範囲であり得る。代表的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に到達するまで組成物を投与する。それゆえ、この組成物は、単一用量として、または経時的に 2 以上の用量 (これは、同じ量の F h m ポリペプチドを含んでも含まなくてもよい) で、または移植デバイスもしくはカテーテルを介して連続注入として投与され得る。

【0297】

さらなる研究が行われるほど、種々の患者における種々の状態の処置のために適切な投薬量レベルに関する情報が明らかになり、そして当業者は、治療的状況、処置されている障害の種類、レシピエントの年齢および一般的健康状態を考慮して、適切な投薬を確実にし得る。

【0298】

インビボでの投与のために用いられる F h m ポリペプチド組成物は無菌でなけ

ればならない。このことは、滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。組成物が凍結乾燥される場合、これらの方法を用いた滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかで行われ得る。非経口投与のための組成物は通常、凍結乾燥形態で、または溶液中に保存される。

【0299】

治療組成物は一般的に、無菌アクセスポートを有する容器（例えば、皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有する、静脈内溶液バッグまたはバイアル）中に入れられる。一旦、薬学的組成物が処方されたら、これは、溶液、懸濁物、ゲル、乳濁物、固体として、または脱水もしくは凍結乾燥された粉末として無菌バイアル中に保存され得る。このような処方物は、すぐ使用可能な（ready-to-use）形態でまたは投与の前に再構成を必要とする形態（例えば、凍結乾燥形態）のいずれかで保存され得る。

【0300】

有効投与形態（例えば、（1）徐放（slow-release）処方物、（2）吸入ミスト（inhalant mist）または（3）経口活性な処方物）もまた、想定される。治療有効量のFhmポリペプチドを含む薬学的組成物もまた、非経口投与のために処方され得る。このような非経口投与される治療的組成物は代表的に、薬学的に受容可能なビヒクル中にFhmを含む、発熱物質を含まない、非経口的に受容可能な水溶液の形態である。Fhmの薬学的組成物はまた、ポリマー性化合物（例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸など）の粒状調製物またはリポソームへのFhmの導入を含み得る。ヒアルロン酸もまた用いられ得、そしてこれは、循環中の持続期間を助長する効果を有し得る。

【0301】

非経口注射のために特に適切なビヒクルは、適切に保護された無菌の等張性溶液としてFhmが処方された、滅菌蒸留水である。なお別の調製物は、タンパク質産物の制御されたかまたは持続した放出を提供し、次いで、蓄積注射として送達され得る、因子（例えば、注射可能なマイクロスフェア、生体侵食性（bio-erodible）粒子もしくはビーズ、またはリポソーム）を伴うFhmの処方物を含み得る。Fhmの導入のための他の適切な手段としては、Fhmおよび

／またはその結合パートナーを含む、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

【0302】

本発明の調製物は、当該分野で周知のように、他の成分（例えば、非経口的に受容可能な保存剤、張度（tonicity）剤、共溶媒、湿潤剤、錯化剤、緩衝剤、抗菌剤、抗酸化剤および界面活性剤）を含み得る。例えば、適切な張度増強剤（tonicity enhancing agent）としては、アルカリ金属ハライド（好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。適切な保存剤としては、塩化ベンザルコニウム、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸などが挙げられるがこれらに限定されない。過酸化水素もまた、保存剤として用いられ得る。適切な共溶媒は、例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールである。適切な錯化剤は、例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンである。適切な界面活性剤または湿潤剤としては、ソルビタンエステル、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート80）、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポール（tyloxapal）などが挙げられる。緩衝剤は、従来の緩衝剤（例えば、ボレート、シトレート、ホスフェート、バイカーボネートまたはTris-HCl）であり得る。

【0303】

処方物成分は、投与部位に受容可能である濃度で存在する。例えば、緩衝剤は、組成物を生理学的pHにまたはわずかに低いpHに（代表的には、約5～約8のpH範囲内に）維持するために用いられ得る。

【0304】

非経口投与が意図される場合、本発明において使用するための治療的組成物は、所望のFhm分子を薬学的に受容可能なビヒクル中に含む、発熱物質を含まない、非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注射のために特に適切なビヒクルは、適切に保存された無菌の等張性溶液としてFhm分子が処方さ

れている、無菌蒸留水である。なお別の調製物は、産物の制御されたかまたは持続した放出を提供し、次いで、蓄積注射を介して送達され得る、因子（例えば、注射可能なマイクロスフェア、生体侵食性粒子、ポリマー性化合物（例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸）またはビーズもしくはリポソーム）とともに所望の分子の処方物を含み得る。ヒアルロン酸もまた用いられ得、そしてこれらは、循環中の持続期間を助長する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段としては、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

【0305】

薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、Fhmは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。FhmポリペプチドまたはFhm核酸分子の吸入溶液はまた、エアゾール送達のためのプロペラントを用いて処方され得る。なお別の実施形態では、溶液が噴霧化され得る。肺投与はさらに、PCT出願第PCT/US94/01875号に記載される。PCT出願第PCT/US94/01875号は、化学的に改変されたタンパク質の肺性送達を記載する。

【0306】

Fhmポリペプチドを含む特定の処方物が経口投与され得ることもまた意図される。1つの実施形態では、この様式で投与されるFhmリガンドは、固体投薬形態の混合物（例えば、錠剤およびカプセル剤）において習慣的に用いられるキャリアを伴ってまたは伴わずに処方され得る。例えば、カプセル剤は、胃腸管にある時点で（このとき、バイオアベイラビリティが最大にされ、そして全身以前（pre-systemic）の分解が最少にされる）処方物の活性な部分を放出するために設計され得る。さらなる薬剤は、Fhmポリペプチドの吸収を促進するために含まれ得る。希釈剤、矯味矯臭剤、低融点ろう、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤および結合剤もまた用いられ得る。

【0307】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切である非毒性賦形剤を伴う混合物中で有効量のFhmポリペプチドを含み得る。滅菌水または他の適切なビヒクル中に錠剤を溶解することによって、溶液は、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては、不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは

は炭酸水素ナトリウム、ラクトースまたはリン酸カルシウム) ; または結合剤 (例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア) ; または滑沢剤 (例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸または滑石) が挙げられるがこれらに限定されない。

【0308】

さらなるFhmポリペプチド薬学的組成物は、持続送達処方物または制御送達処方物においてFhmポリペプチドを含む処方物を含めて、当業者には明らかである。種々の他の持続送達手段または制御送達手段を処方するための技術 (例えば、リポソームキャリア、生体侵食性微粒子または多孔質ビーズおよび蓄積注射) もまた、当業者に公知である。例えば、薬学的組成物の送達のための制御放出多孔性ポリマー性微粒子を記載する、PCT出願第PCT/US93/00829号を参照のこと。さらなる例としては、成形品 (例えば、フィルムまたはマイクロスフェア) の形態の半透性ポリマーマトリックスが挙げられる。

【0309】

特定の実施形態では、本発明は、単回用量投与単位を産生するためのキットに関する。このキットは各々、所望のタンパク質を有する第1の容器および水性処方物を有する第2の容器の両方を備え得る。本発明の範囲内には、単一の室および複数の室の予め充填されたシリンジ (例えば、液体シリンジおよび凍結乾燥シリンジ (lyosyringe)) を含むキットもまた含まれ得る。

【0310】

治療的に用いられる有効量のFhm薬学的組成物は、例えば、治療的状况および目的に依存する。従って、当業者は、処置に適切な投薬量レベルが、部分的に、送達される分子、Fhm分子が用いられる適応症、投与経路、ならびに患者の大きさ (体重、体表面積または器官の大きさ) および患者の状態 (年齢および一般的健康状態) に依存して変動することを認識する。従って、臨床医は、投薬量を力価測定し得、そして投与経路を改変して最適な治療効果を獲得し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約0.1mg/kg ~ 約100mg/kg以上の範囲にわたり得る。他の実施形態では、投薬量は、0.1mg/kg ~ 約100mg/kg ; または1mg/kg ~ 約100mg/kg ; または5mg

/ kg ~ 約 100 mg / kg の範囲にわたり得る。

【0311】

投薬頻度は、用いられる処方物中の F h m 分子の薬物動態学的パラメーターに依存する。代表的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に到達するまで組成物を投与する。それゆえ、組成物は、単一用量として、または経時的に2以上の用量（これは、同じ量の所望の分子を含んでも含まなくてもよい）として、または移植デバイスもしくはカテーテルを介して連続注入として投与され得る。適切な投薬量のさらなる改善は、当業者によって慣用的に行われ、そして当業者によって慣用的に行われる作業の範囲内に入る。適切な投薬量は、適切な用量応答データの使用を通して確認され得る。

【0312】

薬学的組成物の投与経路は、公知の方法（例えば、経口的、静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内（intraportal）もしくは病変内の経路による注射を通して；持続放出系によって、または移植デバイスによって）に従う。所望の場合、組成物は、ボーラス注射によって、または注入によって連続的に、または移植デバイスによって投与され得る。

【0313】

あるいは、またはさらに、組成物は、所望の分子が吸収またはカプセル化された膜、スポンジまたは別の適切な材料の移植を介して局所投与され得る。移植デバイスが用いられる場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官内に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出（timed-release）ボーラスまたは連続投与を介してであり得る。

【0314】

本発明の薬学的組成物を、肺投与によってさらに投与し得る。例えば、国際公開第WO 94/20069号を参照のこと。国際公開第WO 94/20069号は、化学的に改変されたタンパク質肺性送達を開示し、本明細書中に参考として援用される。肺性送達については、粒子の大きさは、肺の遠位への送達に適切であるべきである。例えば、粒子の大きさは、1 mm ~ 5 mmであり得るが、例えば、各粒子がかなり多孔性であれば、より大きな粒子が用いられ得る。ある

いは、またはさらに、この組成物は、罹患した領域への、レセプターポリペプチドが吸収またはカプセル化された膜、スポンジまたは他の適切な材料の移植を介して局所投与され得る。移植デバイスが用いられる場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして送達は、ポラスを介して、または連続投与を介して、または連続注入を用いたカテーテルを介して、デバイスを通して直接的であり得る。

【0315】

Fhm - リガンドポリペプチドおよび/またはその結合パートナーもまた、持続放出処方物または調製中で投与され得る。適切なポリマー組成物は好ましくは、以下であるために固有のおよび制御可能な生分解性を有する：約1週間から約6週間持続し；有意な毒性モノマーを含まず、そして非毒性成分へと分解せず、非毒性であり；生体適合性であり、送達されるべき物質と化学的に適合性であり、そして活性な物質を変性させる傾向はなく；生物学的に活性な分子の取り込み、その後の拡散、腐食もしくはそれらの組み合わせによるポリマーからのそれらの遊離を可能にするに十分に多孔質であり；接着もしくは幾何学的作用 (geometric fraction) によって適用部位に残存し得 (例えば、適切に形成されるかもしくは軟化され、そしてその後、微粒子に成形および形成され、この微粒子は、所望の位置で捕獲される)；侵襲性が最少の技術によって (例えば、カテーテル、腹腔鏡または内視鏡によって) 送達され得る。持続放出マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド (米国特許第3,773,919号、EP 58,481)、L-グルタミン酸と -エチル-L-グルタメートとのコポリマー (Sidmanら, Biopolymers, 22:547-556, 1983)、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート) (Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, 1981およびLanger, Chem. Tech., 12:98-105, 1982)、エチレンビニル酢酸 (Langerら, 前出) またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (EP 133,988) が挙げられる。持続放出組成物はまた、リポソームを含み得る。リポソームは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る (例えば、本明細書中に参考とし

て援用される、Eppsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692, 1985; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949)。

【0316】

Fhmポリペプチド、その改変体、誘導体またはフラグメントは、単独で、一緒に、または他の薬学的組成物と組み合わせで用いられ得る。Fhmポリペプチド、フラグメント、改変体および誘導体は、処置される適応症について適切である場合、サイトカイン、サイトカインインヒビター、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤と組み合わせで用いられ得る。

【0317】

いくつかの場合、Fhmポリペプチドの薬学的組成物をエキソビボの様式で使用する事が所望され得る。このような場合には、患者から取り出された細胞、組織または器官がFhmポリペプチドの薬学的組成物に曝露され、その後、この細胞、組織および/または器官が続いて、その患者に移植し戻される。

【0318】

他の場合、Fhmポリペプチドは、方法(例えば、本明細書中に記載された方法)を用いて、このポリペプチド、フラグメント、改変体または誘導体を発現および分泌するように遺伝子操作された特定の細胞を患者に移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒトの細胞であり得、そして自己、異種(heterologous)または異種(xenogeneic)であり得る。必要に応じて、この細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少させるために、この細胞がカプセル化されて、周囲の組織の浸潤を回避し得ることが好ましい。カプセル化物質は代表的に、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子によるこの細胞の破壊を妨げる、生体適合性の半透性ポリマー性の被包物(enclosure)または膜である。

【0319】

細胞の膜カプセル化のために使用される方法は、当業者に周知であり、そしてカプセル化された細胞の調製および患者中でのそれらの移植は、過度の実験を伴

わずに達成され得る。例えば、本明細書中に参考として援用される、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと。生きている細胞をカプセル化するための系は、国際公開第WO 91/10425号に記載されている。種々の他の持続送達手段または制御送達手段を処方するための技術（例えば、リポソームキャリア、生体侵食性粒子またはビーズ）もまた当業者に周知であり、そして例えば、本明細書中に参考として援用される、米国特許第5,653,975号に記載される。カプセル化を伴うかまたは伴わない細胞は、患者の適切な身体組織または器官に移植され得る。

【0320】

本明細書中に考察されるように、適切な場合、1以上のFhmポリペプチド、改変体、誘導体および/またはフラグメントを添加して、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を処置することが所望され得る。このことは、単離された細胞を、このポリペプチド、改変体、誘導体またはフラグメントに直接曝露することによって達成され得、ここで、これらは、細胞膜に透過性である形態である。

【0321】

本発明は、治療的タンパク質のインビトロ産生、ならびに遺伝子治療による治療的タンパク質の産生および送達の両方のための改善された方法に関する。

【0322】

（相同組換え）

さらに、FhmをコードするDNAを既に含む細胞に導入された制御エレメントを利用して、相同組換えによって、または組換え産生方法を用いて、Fhmタンパク質が産生されることが想定される。例えば、相同組換え方法を用いて、正常には転写的にサイレントなFhm遺伝子または過少発現される遺伝子を含む細胞を改変し、それによって、治療的に効力のある量のFhmを発現する細胞を産生し得る。相同組換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または正すために遺伝子を標的化するために元々開発された技術である（Kucherlapti, Prog. in Nucl. Acid Res. and Mol. B

iol., 36:301, 1989)。基本的技術は、特定の変異を、哺乳動物ゲノムの特定の領域へ導入するための方法として(Thomasら、Cell, 44:419-428, 1986; ThomasおよびCapecchi, Cell, 51:503-512, 1987; Doetschmanら, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:8583-8587, 1988)、または欠損遺伝子内の特定の変異を正すための方法として(Doetschmanら, Nature, 330:576-578, 1987)開発された。例示的な相同組換え技術は、本明細書中に参考として援用される、米国特許第5,272,071号、EP公開第91 90 3051号、EP公開第505 500号; PCT/US90/07642、国際公開第WO 91/09955に記載される。

【0323】

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

【0324】

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

するDNAの転写に影響を与えるに十分に近位でかつ十分な方向で、意図される宿主細胞のゲノムに挿入される。制御エレメントは、宿主細胞ゲノム中に存在する一部のDNAを制御する。従って、Fhmタンパク質の発現は、Fhm遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、Fhmタンパク質の転写について認識可能なシグナルと内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合された標的化DNA（目的の内因性遺伝子と相同な領域を含む）の使用によって達成され得る。

【0325】

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

【0326】

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

【0327】

相同組換えを用いて、細胞の内因性Fhm遺伝子からのFhmポリペプチド産生を増大させ得るかまたは生じさせ得る1つの方法は、第1に、相同組換えを用いて部位特異的組換え系（例えば、Cre/LoxP、FLP/FRT）（S

auer, *Current Opinion In Biotechnology*, 5: 521 - 527, 1994; および Sauer, *Methods In Enzymology*, 225: 890 - 900, 1993を参照のこと)由来の組換え配列を、細胞のゲノムの内因性Fhmポリペプチドコード領域の上流に(すなわち、5'に)配置することを含む。ゲノムのFhmポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に相同な組換え部位を含むプラスミドは、改変された細胞株に、適切なレコンビナーゼ酵素を伴って導入される。このレコンビナーゼ酵素は、このプラスミドが、プラスミドの組換え部位を介して、その細胞株においてゲノムのFhmポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込まれることを引き起こす(BaubonisおよびSauer, *Nucleic Acids Res.*, 21: 2025 - 2029, 1993; およびO'Gormanら, *Science*, 251: 1351 - 1355, 1991)。転写を増大させることが公知の任意の隣接配列(例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロンまたは翻訳エンハンサー)は、このプラスミド内に適切に配置された場合、新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で組み込まれて、細胞の内因性Fhm遺伝子からのデノボFhmポリペプチド産生または増大したFhmポリペプチド産生をもたらす。

【0328】

部位特異的な組換え配列が、その細胞の内因性ゲノムFhmポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する細胞株を使用するためのさらなる方法は、相同組換えを使用して、第2の組換え部位を、この細胞株のゲノムの他の箇所に導入することである。次いで、適切なレコンビナーゼ酵素が、2組換え部位細胞株に導入されて、この細胞の内因性Fhm遺伝子からのデノボかまたは増加したFhmポリペプチド産生を生じる、新たな転写ユニットまたは改変された転写ユニットを作製する、組換え事象(欠失、逆位、または転座)を引き起こす(Sauer, *Current Opinion In Biotechnology*, 前出, 1994; およびSauer, *Methods In Enzymology*, 前出, 1993)。

【0329】

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

【0330】

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

【0331】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中に提示される F h m の核酸配列）が既知である場合には、この遺伝子の選択された位置に相補的な DNA 片が、例えば、天然の DNA の、目的の領域に結合している特異的な認識部位における適切な制限によって、合成され得るか、または他の様式で得られ得る。この片は、細

胞への取り込みの際の標的化配列として働き、そしてゲノム内のその相同領域とハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に起こる場合には、このDNA片、およびこのDNA片に付着した任意のさらなる配列が、岡崎フラグメントとして働き、そして新に合成されたDNAの娘鎖に取り込まれる。従って、本発明は、Fhmポリペプチドをコードするヌクレオチドを包含し、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

【0332】

あるいは、遺伝子治療が、以下に記載されるように使用され得る。

【0333】

(Fhm細胞治療および遺伝子治療)

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

【0334】

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

た、患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしに、患者に直接移植され得る。

【0335】

生存細胞をカプセル化するための技術は、当該分野において公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびこれらの患者への移植は、過度の実験なしに達成され得る。例えば、Baetgeら(WO 95105452およびPCT/US94/09299)は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のための、遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。これらのカプセルは生体適合性であり、そして容易に回収可能である。これらのカプセルは生体適合性であり、そして容易に回収可能である。これらのカプセルは、プロモーターに作動可能に連結した生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化し、これらの細胞は、哺乳動物宿主への移植の際に、インビボでのダウンレギュレーションに曝されない。このデバイスは、生存細胞からレシピエント内の特異的な部位への分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号、同第5,011,472号、および同第5,106,627号を参照のこと(本明細書中に参考として援用される)。生存細胞をカプセル化するための系は、Aebischerらの国際出願WO 91/10425、Aebischerらの国際出願WO 91/10470; Winnら、Exper. Neurol., 113:322-329, 1991, Aebischerら、Exper. Neurol., 111:269-275, 1991; およびTrescoら、ASAIO, 38:17-23, 1992(本明細書中に参考として援用される)に記載されている。

【0336】

Fhmの、インビボおよびインビトロでの遺伝子治療送達もまた、本発明に含まれる。インビボ遺伝子治療は、Fhmをコードする遺伝子を、ポリヌクレオチド分子または他の適切な送達ベクターの局所的注射によって、細胞に導入することによって、達成され得る(Hefti, J. Neurobiology, 25:1418-1435, 1994)。例えば、Fhmをコードするポリヌクレオチド分子は、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルスベクター

に含まれ得る(例えば、国際公開番号WO 95/34670;国際出願番号PCT/US95/07178を参照のこと)。組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムは、代表的に、機能的プロモーターに作動可能に連結したFhmをコードするDNA配列に隣接するAAV逆方向末端反復、およびポリアデニル化配列を含む。

【0337】

代替のウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクターおよびパピローマウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号(1997年9月30日発行、Kelleyら、University of Michigan)は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含む、インビボのウイルスにより媒介される遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号(1995年3月21日発行、Andersonら、Department of Health and human Services)は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するようインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、患者に治療タンパク質を提供するためのプロセスの例を、提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号(1997年5月20日発行、Wooら、Baylor College of Medicine)(アデノウイルスベクターを含む);米国特許第5,672,510号(1997年9月30日発行、Eglitisら、Genetic Therapy, Inc.)(レトロウイルスベクターを含む);および米国特許第5,635,399号(1997年6月3日発行、Krieglerら、Chiron Corporation)(サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む)に記載されている。

【0338】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNA送達(直接注射)、レセプター媒介移入(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられる。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導的プロモーター

、組織特異的エンハンサー - プロモーター、部位特異的取り込みのために設計されたDNA配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全性の尺度）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号（1990年11月13日発行、D.C.Chang, Baylor College of Medicine）（エレクトロポレーション技術）；国際出願WO 9640958（961219公開、Smithら、Baylor College of Medicine）（核リガンド）；米国特許第5,679,559号（1997年10月21日発行、Kimら、University of Utah Research Foundation）（遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を考慮する）；米国特許第5,676,954号（1997年10月14日発行、K.L.Brigham, Vanderbilt University）（リポソームキャリアを含む）；米国特許第5,593,875号（1997年1月14日発行、Wurmら、Genentech, Inc.）（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を考慮する）；および米国特許第4,945,050号（1990年7月31日発行、Sanfordら、Cornell Research Foundation）（ここで、生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通する速度で推進され、そしてこの細胞の内側に取り込まれる）に記載されている。発現制御技術としては、化学的に誘導される調節（例えば、国際出願WO 9641865およびWO 9731899）、改変されたステロイドホルモンレセプター系におけるプロゲステロンアンタゴニストの使用（例えば、米国特許第5,364,791号）、エクジソン制御系（例えば、国際出願WO 9637609）ならびにポジティブテトラサイクリン制御可能トランスアクチベーター（例えば、米国特許第5,589,362号；同第5,650,298号；および同第5,654,168号）が挙げられる。

【0339】

F h m 遺伝子治療または細胞治療が、第二のタンパク質の送達をさらに含む得ることもまた、考慮される。例えば、宿主細胞が、F h m と T F N - の両方、または F h m および I L - 1 の可溶性形態を発現し、そして放出するように、改変され得る。あるいは、F h m および T N F - 、または F h m および I L - 1 は、別の細胞において発現され、そしてその細胞から放出され得る。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス（例えば、上記のカプセル化膜）内に含まれ得る。

【0340】

遺伝子治療が適用され得る1つの様式は、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターに作動可能に連結され得る F h m 遺伝子（F h m ポリペプチドをコードするゲノムDNA、cDNA、および/または合成DNA、あるいはそのフラグメント、改変体、または誘導体のいずれか）を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内因性 F h m 遺伝子に対して相同であっても異種であってもよいが、但し、この構築物が挿入される細胞または組織型において、このプロモーターが活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、要求されるように、部位特異的取り込みのために設計されたDNA分子（例えば、相同組換えのために有用な内因性隣接配列）、組織特異的なプロモーター、エンハンサー、またはサイレンサー、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標的として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクターの製造を可能にする因子を含む得る。

【0341】

次いで、遺伝子治療DNA構築物は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して、患者の細胞に（エキソビボまたはインビボでのいずれかで）導入され得る。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの手段である。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）が、DNA構築物を細胞の染色

体DNAに送達し、そしてこの遺伝子が、染色体DNAに取り込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質内に残る。遺伝子治療ベクターの使用は、例えば、米国特許第5,672,344号；同第5,399,346号；同第5,631,236号；および同第5,635,399号（本明細書中に参考として援用される）に記載されている。

【0342】

なお他の実施形態においては、調節エレメントは、標的細胞におけるFhm遺伝子の制御された発現に関与し得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに対する応答の際に、オンにされる。この様式で、治療ポリペプチドは、所望のときに発現され得る。1つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性化タンパク質）を二量化するために使用される、低分子二量化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（WO 9641865（PCT/US96/099486）；WO 9731898（PCT/US97/03137）およびWO9731899（PCT/US95/03157）WO 9731899（PCT/US95/03157）に記載されるように）。タンパク質の二量化を使用して、導入遺伝子の転写を開始し得る。

【0343】

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

【0344】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、以下の系が挙げられるが、それらに限定されない。ミフェプリストン(RU486)が、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインを、プロゲステロンアンタゴニストに結合させることによって、2つの転写因子の二量体の形成による転写が活性化され、これが次いで、結合DNAの核内に通される。このリガンド結合ドメインは、そのレセプターがその天然のリガンドに結合する能力を排除するよう改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系が、米国特許第5,364,791号;WO9640911およびWO9710337、WO9640911およびWO9710337に、さらに記載されている。

【0345】

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

【0346】

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

【0347】

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

【0348】

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

【0349】

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

(サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む)に記載されている。

【0350】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNA送達(直接注射)、レセプター媒介移入(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導的プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的取り込みのために設計されたDNA配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系(安全性の尺度)、細胞特異的結合因子(細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子の使用、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号(エレクトロポレーション技術を含む);WO9640958(核リガンドを含む);米国特許第5,679,559号(遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する);米国特許第5,676,954号(リポソームキャリアを含む);米国特許第5,593,875号(リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を考慮する);および米国特許第4,945,050号(ここで、生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通する速度で推進され、そしてこの細胞の内側に取り込まれる)に記載されている。

【0351】

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

るFhm遺伝子がT細胞において「オンにされる」場合には、Ickプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、添加される転写エレメントの機能性部分が、標準的なクローニング技術を使用して、Fhmポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクター、5'および/または3'隣接配列などに挿入され得る）。次いで、この構築物（「相同組換え構築物」として公知）が、エキソビボでかまたはインビボでのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0352】

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

物の取り込みは、相同組換えを介し、ここで、プロモーター構築物における5'および3' DNA配列は、ハイブリダイゼーションを介する内因性染色体DNAへの改変されたプロモーター領域の取り込みを補助するよう作用する。

【0353】

(Fhm核酸およびポリペプチドのさらなる用途)

本発明の核酸分子(それ自体で生物学的に活性なポリペプチドをコードしないものを含む)を使用して、Fhm遺伝子および関連する遺伝子の位置を、染色体上にマッピングし得る。マッピングは、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーションのような、当該分野において公知の技術によって、なされ得る。

【0354】

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

【0355】

Fhmポリペプチドを、1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗体、抗炎症剤、および/または化学療法剤と、処置されている適応症に適切であるように、組み合わせて(同時にかまたは連続的に)使用し得る。

【0356】

1つ以上のFhmポリペプチドの活性を阻害することが所望である場合には、他の方法もまた使用され得る。このような阻害は、発現制御配列(三重らせん形成)またはFhm mRNAに相補的であり、そしてこれらとハイブリダイズする核酸分子によって、生じ得る。例えば、選択されたFhm遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する、アンチセンスDNAまたはRNA分子が、細胞に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるFhmポリペプチドの配列を使用して、利用可能な技術によって、設計され得る。代表的に、このようなアンチセンス分子の各々は、各選択されたFhm遺伝子の開始部位(5'末端)に相補的である。次いで、このアンチセンス分子が、対応するF

h m m R N A とハイブリダイズする場合には、このm R N A の翻訳が、防止または低下される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物におけるF h m ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

【0357】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1つ以上のF h m ポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択されたF h m ポリペプチドの変異ポリペプチドをコードするD N A が調製され得、そして本明細書中に記載されるようなウイルスの方法または非ウイルスの方法のいずれかを使用して、患者の細胞に導入され得る。各このような変異体は、代表的に、内因性ポリペプチドと、その生物学的役割において競合するよう設計される。

【0358】

さらに、F h m ポリペプチドは、生物学的に活性であってもそうでなくても、免疫原として使用され得る。すなわち、このポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。F h m ポリペプチドに結合する選択的結合因子（本明細書中に記載されるような）を、インビボおよびインビトロの診断目的（体液または細胞のサンプルにおけるF h m ポリペプチドの存在を検出するために標識された形態での使用が挙げられるが、これらに限定されない）で使用し得る。この抗体はまた、多数の疾患および障害（本明細書中に記載したものを含む）を予防、処置、または診断するために、使用され得る。この抗体は、F h m ポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を低下またはブロックするように、F h m ポリペプチドに結合し得るか、あるいはF h m ポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を増加させる（F h m ポリペプチドの薬物速度論を増加させることによるものを含む）ように、ポリペプチドに結合し得る。

【0359】

E . c o l i においてF h m ポリペプチドをコードするc D N A は、 ___ にA T C C に寄託され、そしてA T C C 登録番号 ___ を有する。

【0360】

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

【0361】

(実施例1)

(ヒトFhmをコードするDNAの単離)

Amgen発現配列タグ(EST)データベースのTNFファミリープロファイルサーチにより、可能性のあるTNFリガンドファミリーメンバーをコードするヒトマクロファージcDNAから、Fhm1-00016-g12と名付けられたESTクローンが同定された。以下のプライマーを使用する、5637細胞株(ATCC#HTB-9)から調製された第一鎖cDNAのPCRによって、Fhmをコードする全長cDNAを得た:

【0362】

【化1】

1406-53: 5' GCCGAGGATCTGGGA CTGA (配列番号 1)

1468-66 5' TCGCCAATCCTCCAACCCATCTTA (配列番号 2)

Fhm cDNAは、819ヌクレオチド(配列番号3)を含み、そして251アミノ酸(配列番号4)を含むポリペプチドをコードする。これは、推定Fhmタンパク質配列によるSwissProtデータベースのFastaサーチにより、C末端の162アミノ酸の重複部(overlap)において28%の同一性を有するTNFaに主に関連することが示された。他のTNFリガンドファミリーメンバーと同様に、Fhmは、短いN末端細胞内ドメイン(アミノ酸1-36)、疎水性膜貫通領域(アミノ酸37-56)、および長いC末端細胞外ドメイン(アミノ酸57-251)を含む、タイプIIの膜貫通タンパク質である。FhmのC末端細胞外ドメインは、TNFリガンドファミリーの保存領域(Smithら、Cell 76:952-62、1994)のほとんどを含んでいた。

【0363】

(実施例2)

(F h mの組織特異的発現)

F h m遺伝子の組織特異的発現パターンは、プローブとして³²P標識PCR産物を使用する、種々の組織におけるF h m転写物の存在を検出するノーザンブロット分析により調べられ得る。

【 0 3 6 4 】

細胞質RNAおよびポリ-A+RNAは、標準的技術 (S a m b r o o k , J . ら、M o l e c u l a r C l o n i n g , C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s , N e w Y o r k , (1 9 8 9)) を使用して、胎盤、発生中の胚、および種々の成体組織から単離される。細胞/組織を20mlのTRIzol試薬 (B R L) で溶解し、30秒間ホモジナイズし、そして4mlのクロロホルムで抽出する。容器を4000rpmにて30分間遠心分離し、そして水相を新しい容器に移した。10mlのイソプロパノールを加え、混合し、そして4200rpmにて30分間遠心分離することにより、RNAを沈降させた。RNAペレットを10mlの70%エタノールで洗浄し、短く乾燥させ、そして0.5mlのTE緩衝液に再懸濁した。市販のmRNA精製キット (P h a r m a c i a) を使用して、ポリA+RNAを調製する。750μlのTE緩衝液中でのカラムからのポリA+RNAの溶出後、40μlのサンプル緩衝液および1mlのエタノールを加え、そして-70℃に一晩維持することにより、サンプルをエタノール沈降させた。次いで、ホルムアルデヒド/アガロースゲル電気泳動システムを使用して、ポリA+RNAを分画した。電気泳動後、ゲルをプロセスし、RNAをナイロンメンブレンに移した (S a m b r o o k ら (前出) を参照) 。次いで、ノーザンブロットを、5×SSPE、50%ホルムアミド、5×Denhardt溶液、0.5%SDSおよび100μg/ml変性サケ精子DNAを含む20mlのプレハイブリダイゼーション溶液中で42℃にて2~4時間プレハイブリダイズさせる。次いで、ブロットを、6×SSPE、50%ホルムアミド、5×Denhardt溶液、0.5%SDS、100μg/ml変性サケ精子DNAを含む20mlのハイブリダイゼーション溶液中でハイブリダイズさせた。約5ng/mlのランダムプライムした³²P標識 (R a d P r i m e K i t , G I B C O) F h m全長cDNAをプローブとして使用した。ブロット

を42にて18~24時間ハイブリダイズさせた。次いで、プロットを、0.1×SSC、0.1%SDS中で55にて洗浄した。次いで、プロットを、80にて3日間X線フィルムに曝した。Fhmの弱い発現が腎臓において検出された。

【0365】

(実施例3)

(Fhmポリペプチドの産生)

A. 細菌におけるFhmポリペプチドの発現

その配列の5'および3'末端部に対応するプライマーを用いて、PCRを使用してFhmポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。増幅されたDNA産物は、発現ベクター中への挿入を可能にする制限酵素部位を含むように改変され得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的な組換えDNA法を用いて発現ベクター中に挿入する。代表的なベクター(例えば、luxプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むpAMG21(ATCC第98113号))を、挿入されるDNAの方向性のあるクローニングのためにBamHIおよびNdeIで消化する。連結された混合物を、エレクトロポレーションによってE.coli宿主株393中に形質転換させ、そして形質転換体をカナマイシン耐性について選択する。選択されたコロニー由来のプラスミドDNAを単離し、そしてDNA配列決定に供してインサートの存在を確認する。

【0366】

形質転換した宿主細胞を、誘導の前に、30μg/mlのカナマイシンを含む2×YT培地中で30にてインキュベートする。次いで、N-(3-オキソヘキサノイル)-d,l-ホモセリンラク톤を30ng/mlの最終濃度まで添加し、続いて30または37のいずれかにて6時間インキュベートすることにより、遺伝子発現を誘導し得る。培養物の遠心分離、細菌ペレットの再懸濁および溶解、ならびにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって、Fhmポリペプチドの発現を評価する。

【0367】

F h mポリペプチドを含む封入体を以下のとおり精製する：細菌細胞を遠心分離によりペレット化し、そして水中に再懸濁する。細胞懸濁物を超音波処理により溶解させ、そして195,000×gにて5～10分間の遠心分離によりペレット化する。上清を捨て、そしてペレットを洗浄してホモジナイザーに移す。ペレットを5mlのPercoll溶液(75%液体Percoll・0.15M NaCl)中で均質に懸濁するまでホモジナイズし、次いで21,600×gにて30分間遠心分離する。封入体を含むグラジエント画分を回収してプールする。単離した封入体をSDS-PAGEにより分析する。組換えF h mタンパク質を上記のようにして精製した(WO98/46751)。

【0368】

(実施例4)

(抗F h m抗体の作成)

F h mポリペプチドに対する抗体は、精製したF h mタンパク質または生物学的もしくは化学的合成により生成したF h mペプチドでの免疫によって得られ得る。実質的に純粋なF h mタンパク質またはポリペプチドは、実施例3に記載のようにトランスフェクトされた細胞から単離され得る。最終調製物におけるタンパク質濃度は、例えば、アミコンフィルターデバイスでの濃縮により、数マイクログラム/mlのレベルに調整され得る。次いで、このタンパク質に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、HudsonおよびBay「Practical Immunology 第2版」Blackwell Scientific Publications(本明細書中に参考として援用する)に記載されているような、抗体生成のための当該分野で公知の手順のいずれかにより調製され得る。

【0369】

単一タンパク質の異種エピトープに対する抗体を含むポリクローナル抗血清は、上記の発現タンパク質(このタンパク質は改変されないか、または免疫原性を高めるために改変され得る)で適切な動物を免疫することにより調製され得る。効果的なポリクローナル抗体生成は、抗原および宿主種の両方に関連する多くの因子によって影響される。例えば、小さな分子は、大きな分子より免疫原性が少

ない傾向があり、キャリアまたはアジュバントの使用を必要とし得る。また、宿主動物は、接種部位および用量に応じて変化し、不適切であるか、または過剰な用量の抗原は共に低い力価の抗血清を生じる。複数の皮内部位での少用量 (ng レベル) の抗原が、最も確実なようである。ウサギについての効果的な免疫プロトコルは、Vaitukaitis, J.ら、J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 988-991、1971に見出され得る。

【0370】

規則的な間隔でブースター注射が与えられ、そして半定量的に (例えば、寒天における、公知の濃度の抗原に対する二重免疫拡散法により) 決定されるような抗体力価が落ち始めるときに、抗血清が採取され得る (例えば、Handbook of Experimental Immunology (D. Weir 編, Blackwell, 1973) 中のOuchterlony, Oら、第19章を参照)。プラトーな抗体濃度は、通常、0.1~0.2 mg/ml血清の範囲である (約12 μ M)。抗原に対する抗血清の親和性は、例えば、Manual of Clinical Immunology 第2版 (RoseおよびFriedman編、Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D.C., 1980) 中のFisher, D., 第42章) により記載されるような、競合結合曲線を調製することにより決定される。

【0371】

抗Fhm抗体を得るための別の手順 (例えば、完全なヒト抗体を生成するためのヒトIg遺伝子座を有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリ (例えば、抗体の可変領域の変異誘発によって作成された抗体ライブラリ) のスクリーニング) もまた用いられ得る。

【0372】

(実施例5)

(Fhmの役割の機能分析)

インビボにおけるFhmの機能的役割を決定するため、Fhm遺伝子を、動物の生殖系列において過剰発現させるか、または相同組換えにより哺乳動物の生殖系列において不活化させる (例えば、米国特許第5,489,743号および国際

特許公開第WO94/28122号を参照；本明細書中に参考として援用する）。この遺伝子を外因性もしくは内因性プロモーターエレメントの調節制御の下で過剰発現する動物は、トランスジェニック動物として知られる。内因性遺伝子が相同組換えにより不活化されている動物もまた、「ノックアウト」動物として知られている。代表的な哺乳動物には、ウサギおよびげっ歯類の種（例えば、マウス）が含まれる。

【0373】

トランスジェニック動物は、発生および疾患プロセスに対する、Fhmの過剰発現または不適切な発現の効果の決定を可能にする。Fhmトランスジェニック動物はまた、レセプター媒介Fhm活性を調整し得る化合物を試験するためのモデル系として供され得る。

【0374】

「ノックアウト」動物は、胚発生ならびに免疫および増殖応答におけるFhmの役割の決定を可能にする。発生ならびに免疫および増殖応答におけるFhmの役割は、これらの動物において、胚の発生ならびに種々の器官および組織（例えば、免疫系）の発生および分化に対する遺伝子ノックアウトの効果の分析（発生の異なる段階での細胞集団のFACS分析により決定されるような）により決定される。

【0375】

（実施例6）

（可溶性TNFレセプターファミリーメンバーNTR3によるFhmの特異的認識）

レセプター結合アッセイのため、 2×10^5 のCOS-7細胞を、6ウェルプレートに播種した。翌日、リポフェクタミン法により製造業者（Gibco BRL）の指示に従ってFhmの発現プラスミドで細胞をトランスフェクトした。真核細胞発現ベクターPCEP4（Invitrogen）を使用してcDNA構築物を作成した。トランスフェクションの48時間後、組織培養培地を、ヒトIgG Fc部分と融合させたTNFレセプターファミリーメンバーを含む組織培養培地と交換した。室温（RT）での1時間のインキュベーション後、細胞

を5mlのPBSで3回洗浄した。次いで、細胞を、5%BSAおよび1:500希釈のアルカリホスファターゼ(Sigma)結合ヤギ抗ヒトIgG Fcを含むDMEM培地中で、RTにてさらに1時間インキュベートした。5mlのTBS緩衝液での3回の洗浄後、Fast Red TR/AS-MX Substrate Kit(Pierce)で細胞を染色した。顕微鏡下での視覚による検査によってポジティブ染色を決定した。FhmトランスフェクトCOS-7細胞は、NTR3Fc融合タンパク質により特異的に認識された。NTR3タンパク質(TNFレセプタースーパー遺伝子ファミリーのメンバー)は、1999年8月4日に出願した、共有に係る共願の米国仮特許出願(代理人整理番号第01017/35549号;その全体を本明細書中に参考として援用する)に詳細に記載されている。

【0376】

本発明は、好適な実施態様に関して記載されているが、当業者に変形および改変が思い浮かぶことは理解される。したがって、添付の特許請求の範囲は、特許請求の範囲に記載の本願発明の範囲内にある等価な変形のすべてを含むと意図される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Amgen, Inc.
 <120> Fhm, A Novel Member of the TNF Ligand Supergene Family
 <130> 01017/35550A
 <140>
 <141>
 <150> US 60/147,294
 <151> 1999-08-04
 <160> 22
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 1
 gccgaggatc tgggactga 19
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 2
 tcgccaatcc tccaacccat cttta 24
 <210> 3
 <211> 819
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (37)..(789)
 <220>
 <223> Hu-Fhm
 <400> 3
 aagctgggta cagctgctag caagctctag accacc atg gcc gag gat ctg gga 54
 Met Ala Glu Asp Leu Gly
 1 5

ctg agc ttt ggg gaa aca gcc agt gtg gaa atg ctg cca gag cac ggc	102
Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu Met Leu Pro Glu His Gly	
10 15 20	
agc tgc agg ccc aag gcc agg agc agc agc gca cgc tgg gct ctc acc	150
Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser Ala Arg Trp Ala Leu Thr	
25 30 35	
tgc tgc ctg gtg ttg ctc ccc ttc ctt gca gga ctc acc aca tac ctg	198
Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala Gly Leu Thr Thr Tyr Leu	
40 45 50	
ctt gtc agc cag ctc cgg gcc cag gga gag gcc tgt gtg cag ttc cag	246
Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu Ala Cys Val Gln Phe Gln	
55 60 65 70	
gct cta aaa gga cag gag ttt gca cct tca cat cag caa gtt tat gca	294
Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala	
75 80 85	
cct ctt aga gca gac gga gat aag cca agg gca cac ctg aca gtt gtg	342
Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val	
90 95 100	
aga caa act ccc aca cag cac ttt aaa aat cag ttc cca gct ctg cac	390
Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His	
105 110 115	
tgg gaa cat gaa cta ggc ctg gcc ttc acc aag aac cga atg aac tat	438
Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr	
120 125 130	
acc aac aaa ttc ctg ctg atc cca gag tgc gga gac tac ttc att tac	486
Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr	
135 140 145 150	
tcc cag gtc aca ttc cgt ggg atg acc tct gag tgc agt gaa atc aga	534
Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg	
155 160 165	
cga gca ggc cga cca aac aag cca gac tcc atc act gtg gtc atc acc	582
Arg Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr	
170 175 180	
aag gta aca gac agc tac cct gag cca acc cag ctc ctc atg ggg acc	630
Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr	
185 190 195	
aag tct gta tgc gaa gta ggt agc aac tgg ttc cag ccc atc tac ctc	678
Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu	
200 205 210	
gga gcc atg ttc tcc ttg caa gaa ggg gac aag cta atg gtg aac gtc	726
Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val	
215 220 225 230	
agt gac atc tct ttg gtg gat tac aca aaa gaa gat aaa acc ttc ttt	774
Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe	
235 240 245	

gga gcc ttc tta cta tagtaggtcg aggccggcaa ggccggatcc
 Gly Ala Phe Leu Leu
 250

819

<210> 4
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
 35 40 45
 Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
 50 55 60
 Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
 65 70 75 80
 His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
 85 90 95
 Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
 100 105 110
 Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
 115 120 125
 Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
 130 135 140
 Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
 145 150 155 160
 Glu Cys Ser Glu Ile Arg Arg Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser
 165 170 175
 Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
 180 185 190
 Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
 195 200 205
 Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
 210 215 220
 Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
 225 230 235 240
 Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
 245 250

<210> 5
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn
 1 5 10 15
 Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu
 20 25 30
 Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr
 35 40 45
 Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys
 50 55 60
 Asn Asn Leu Pro Leu
 65

<210> 6
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 6
 Glu Lys Lys Glu Pro Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro His
 1 5 10 15
 Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu
 20 25 30
 Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr
 35 40 45
 Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Gln
 50 55 60
 Pro Leu
 65

<210> 7
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Rat

<400> 7
 Glu Thr Lys Lys Pro Arg Ser Val Ala His Leu Thr Gly Asn Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser Arg Ser Ile Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Thr Ala Leu
 20 25 30
 Ile Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Ala
 35 40 45
 Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Ser Gln
 50 55 60

Pro Leu
65

<210> 8
<211> 71
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala Ser
1 5 10 15
Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr
20 25 30
Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val
35 40 45
Lys Arg Gln Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu
50 55 60
Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe
65 70

<210> 9
<211> 74
<212> PRT
<213> Mouse

<400> 9
Gly Asp Glu Asp Pro Gln Ile Ala Ala His Val Val Ser Glu Ala Asn
1 5 10 15
Ser Asn Ala Ala Ser Val Leu Gln Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr
20 25 30
Met Lys Ser Asn Leu Val Met Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr Val
35 40 45
Lys Arg Glu Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Thr Gln Val Thr Phe Cys Ser
50 55 60
Asn Arg Glu Pro Ser Ser Gln Arg Pro Phe
65 70

<210> 10
<211> 77
<212> PRT
<213> Mouse

<400> 10
Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala
1 5 10 15
Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His
20 25 30
Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys
35 40 45

Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys
 50 55 60

Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp
 65 70 75

<210> 11
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Ser Lys Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr
 1 5 10 15

Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His
 20 25 30

Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys
 35 40 45

Leu Ile Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys
 50 55 60

Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu
 65 70 75

<210> 12
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly
 1 5 10 15

Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu
 20 25 30

Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe
 35 40 45

Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys
 50 55 60

Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Glu Asn Thr
 85

<210> 13
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 13
 Gly Gly Arg Pro Gln Lys Val Ala Ala His Ile Thr Gly Ile Thr Arg
 1 5 10 15

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

<210> 14
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Arg Ala Pro Phe Lys Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His
 1 5 10 15
 Leu Asn Lys Thr Lys Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly
 20 25 30
 Val Arg Tyr Gln Asp Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Phe Ile Ile
 35 40 45
 Cys Gln Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu
 50 55 60

<210> 15
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 15
 Ser Thr Pro Ser Lys Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ser Lys His
 1 5 10 15
 Leu Asn Asn Thr Lys Leu Ser Trp Asn Glu Asp Gly Thr Ile His Gly
 20 25 30
 Leu Ile Tyr Gln Asp Gly Asn Leu Ile Val Gln Phe Pro Phe Ile Val
 35 40 45
 Cys Gln Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Ser Asn His Ser Val Asp Leu
 50 55 60

<210> 16
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Asp Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Pro Leu
 1 5 10 15

Lys Gly Gln Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Lys Glu Gln Ala Phe Leu
 20 25 30
 Thr Ser Gly Thr Gln Phe Ser Asp Ala Glu Gly Leu Ala Leu Pro Gln
 35 40 45
 Asp Tyr Leu Tyr Cys Leu Val Gly Tyr Arg Gly Arg Ala Pro Pro Gly
 50 55 60
 Gly Gly Asp Pro Gln Gly Arg Ser Val
 65 70

<210> 17
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 17
 Asp Leu Asn Pro Glu Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Trp Met
 1 5 10 15
 Ser Gly Gln Gly Leu Ser Trp Glu Ala Ser Gln Glu Glu Ala Phe Leu
 20 25 30
 Arg Ser Gly Ala Gln Phe Ser Pro Thr His Gly Leu Ala Leu Pro Gln
 35 40 45
 Asp Gly Val Tyr Tyr Leu Tyr Cys His Val Gly Tyr Arg Gly Arg Thr
 50 55 60
 Pro Pro Ala Gly Arg Ser Arg Ala Arg Ser Leu
 65 70 75

<210> 18
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Ala His Ser Thr Leu Lys Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser
 1 5 10 15
 Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu
 20 25 30
 Gln Asp Gly Phe Ser Leu Ser Asn Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser
 35 40 45
 Gly Ile Tyr Phe Val Tyr Ser Gln Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr
 50 55 60
 Ser Pro Lys Ala Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Leu
 65 70 75

<210> 19
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 19
 Thr His Gly Ile Leu Lys Pro Ala Ala His Leu Val Gly Tyr Pro Ser
 1 5 10 15
 Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg Ala Ser Thr Asp Arg Ala Phe Leu
 20 25 30
 Arg His Gly Phe Ser Leu Ser Asn Asn Ser Leu Leu Ile Pro Thr Ser
 35 40 45
 Phe Val Tyr Ser Gln Val Val Phe Ser Gly Glu Ser Cys Ser Pro Arg
 50 55 60
 Ala Ile Pro Thr Pro Ile Tyr Leu
 65 70

<210> 20
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln
 1 5 10 15
 Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu
 20 25 30
 Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu
 35 40 45
 Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys
 50 55 60
 Pro Ser Thr His Val Leu Leu
 65 70

<210> 21
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 21
 Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn His Gln
 1 5 10 15
 Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg Ala Asn Ala Leu Leu
 20 25 30
 Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ala Asp
 35 40 45
 Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys
 50 55 60
 Pro Asp Tyr Val Leu Leu
 65 70

```

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

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

<400> 17
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
  1             5             10

```

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、Pileupプログラム(Wisconsin GCG Program Package ver. 8.1)を用いて以下の対応する領域と整列されたFhmポリペプチド(配列番号4)の推定アミノ酸配列の整列を示す: ヒトFasL、マウスFasL、ラットFasL、ヒトCD40L、マウスCD40L、マウスOPGL、ヒトOPGL、ヒトTRAIL、マウスTRAIL、ヒトCD30L、ヒトCD30L、ヒトLyT-、マウスLyT-、ヒトTNF-、マウスTNF-、ヒトTNF- およびマウスTNF- (配列番号5~21)。

【図1】

	B	B/B'ループ	C'	C	
139-	-----+PAAHLT--P-----	-----L-W-----			コンセンサス
137-	EKKELRKVAHLTGKSN-----	-----SRS-MPLEWEDTYGI--			ヒト FasL (配列番号 5)
136-	EKKPRSV AHLTGPH-----	-----SRS-IPLEWEDTYGT--			マウス FasL (配列番号 6)
116-	GDQNPQIAAHVISEASS-----	-----KTT-SVLQWAEKGY--			ヒト CD40L (配列番号 7)
115-	GDEDQIAAHVVSEANS-----	-----NAA-SVLQWAKKGY--			マウス CD40L (配列番号 8)
157-	GKPEAQFFAHLTINAASIP-----	-----SGSHKVTLSWYHDRGW--			マウス OPGL (配列番号 9)
158-	SKLEAQFFAHLTINATDIP-----	-----SGSHKVSLSWYHDRGW--			ヒト OPGL (配列番号 10)
116-	ERGPQVAAHITGTRRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSGH-				ヒト TRAIL (配列番号 11)
120-	GGRPQKVAAHITGITRRSNSALIPISKDGKTLGQKIESWESSRKGH-				ヒト TRAIL (配列番号 12)
92-	RAPFKKSWAYLQVAKH-----	-----LNK-TKLSWNKDG-----			マウス CD30L (配列番号 13)
97-	STPSKKSWAYLQVSKH-----	-----LNN-TKLSWNEGD-----			ヒト CD30L (配列番号 14)
82-	DLSPGLPAAHLIGAP-----	-----LKGQ-GLGWETTKEQ--			マウス LyTβ (配列番号 15)
148-	DLNPELPA AHLIGAW-----	-----MSGQ-GLSWEASQEE--			ヒト LyTβ (配列番号 16)
57-	AHSTLKPAAHLIGDP-----	-----SKQNS-LLWRANTDR--			マウス TNFβ (配列番号 17)
54-	THGILKPA AHLVGY-----	-----SKQNS-LLWRASTDR--			ヒト TNFβ (配列番号 18)
82-	RTPSDKPVAHVVANP-----	-----QAEQG-LOWLNRRAN--			マウス TNFβ (配列番号 19)
85-	QNSSDKPVAHVVANH-----	-----QVEEQ-LEWLSQRAN--			ヒト TNFα (配列番号 20)
89-	RADGDKPRAHLTVVRQTP-----	-----TQHFKNQFPALHWEHELGL--			マウス TNFα (配列番号 21)
					ヒト Fhm (配列番号 4)

【 図 1 】

(図 1 の フラグ)

D D/E ルー E

A-LS	GV-L-N	---	LVV	---	GLYFIYSQV-F+GQ-CP	-----	V-L	コンセンサス	
169-	VLLS	-GVKYKK	-GGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCN	-----	NLPL	-----		Hit	FasL
167-	ALIS	-GVKYKK	-GGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCN	-----	NQPL	-----		マウス	FasL
166-	ALIS	-GVKYKK	-GGLVINEAGLYFVYSKVYFRGQSCN	-----	SQPL	-----		ラット	FasL
147-	TMSNNLV	LENG	-KQITVKRQGLYYIAQVTFCSNREA	-----	SSQAPF	-----		Hit	CD40L
146-	TMKSNLV	MLENG	-KQITVKRQGLYYIVYVTFCSNREP	-----	SSQRPF	-----		マウス	CD40L
193-	AKISN	-MTLSNG	-K-LRVNQDGFYLYANICFRHHETS	-----	GSVPTD	-----		マウス	OPGL
194-	AKISN	-MTFSNG	-K-LIVNQDGFYLYANICFRHHETS	-----	GDLATE	-----		Hit	OPGL
162-	SFLSN	-LHLRNG	-E-LVIHEKGFYIYSQTYFRFQEE	-----	IKENT	-----		Hit	TRAIL
166-	SFLNH	-VLFNRG	-E-LVIEQEGLYIYSQTYFRFQEAEDASKMVSKD	-----		-----		マウス	TRAIL
290-	-ILH	-GVR	YQD--GNLVIQFPGLYFIICQLQFLVQ-CP	-----	NNSVDL	-----		Hit	CD30L
125-	-TIH	-GLI	YQD--GNLIVQFPGLYFIVCQLQFLVQ-CS	-----	NHSVDL	-----		マウス	CD30L
111-	AFLTSGT	QFSDA	-EGLALPQDGLYLYLCLVGYRGRAPPGGDPQGRSV	-----		-----		Hit	LyTβ
117-	AFLRSGA	QFSPT	-HGLALPQDGVYLYLCHVGYRGRTPPA-GRSRARSL	-----		-----		マウス	LyTβ
86-	AFLQDGF	SLSN	--NSLLVPTSGIYFVYSQVVFSGKAYS PKATSSPLYL	-----		-----		Hit	TNFβ
83-	ALLANGF	SLSN	--NSLLIPTSGLYFVYSQVVFSGESCPRAIPTPIYL	-----		-----		マウス	TNFβ
111-	ALLANGV	ELRD	--NQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGCCP	-----	STHVL	-----		Hit	TNFα
114-	ALLANGMDL	KD	--NQLVVPADGLYLVYSQVLFKGGCCP	-----	DYVLL	-----		マウス	TNFα
126-	AFTKNRM	NYTN	--KFLLIPESGDYFIYSQVTFRGMTSECSEIRRAGRP	-----		-----		Hit	Fhm

5) 配列番号
6) 配列番号
7) 配列番号
8) 配列番号
9) 配列番号
10) 配列番号
11) 配列番号
12) 配列番号
13) 配列番号
14) 配列番号
15) 配列番号
16) 配列番号
17) 配列番号
18) 配列番号
19) 配列番号
20) 配列番号
21) 配列番号
4)

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 00/21284
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/28 C07K14/525 C07K17/08 C07K16/24 C07K16/46 C12Q1/68 A61K38/19 G01N33/53 G01N33/566		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
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) BIOSIS, EPO-Internal, STRAND, MEDLINE, 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 99 23105 A (GEORGETOWN UNIVERSITY MEDICAL ; HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); NI) 14 May 1999 (1999-05-14) SEQ ID 27 (protein) shares 99.6% identity in 251 amino acid a overlap (e.g. whole length) with SEQ ID 4. SEQ ID 26 (DNA) is 99.7% identical to SEQ ID 3 in an 760 bp overlap. page 1 -page 137; figures 5A,5B,6A,6B page 3, paragraph 2 -page 5, paragraph 1	1-71
X	WO 96 14328 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; YU GUO LIANG (US); NI JIAN (US); ROSEN) 17 May 1996 (1996-05-17) page 1 -page 6; figure 1	1-71
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 December 2000		Date of mailing of the international search report 09.01.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorizing officer Steffen, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/21284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ORLINICK JASON R ET AL: "TNF-related ligands and their receptors." CELLULAR SIGNALLING, vol. 10, no. 8, 1998, pages 543-551, XP000945103 ISSN: 0898-6568 cited in the application the whole document</p>	
A	<p>NAISMITH JAMES H ET AL: "Modularity in the TNF-receptor family." TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, vol. 23, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 74-79, XP004108007 ISSN: 0968-0004 the whole document</p>	
P,X	<p>WO 00 08139 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;NI JIAN (US); ROSEN CRAIG A (US); ZHANG) 17 February 2000 (2000-02-17) page 1 -page 9; figures 1A-C, 18A-D, 19, 20A, B</p>	1-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/21284**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 44, 58, 63 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 30, 41-43, 44, 45, 46, 71 (all partially)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 30,41-43,44,45,46,71 (all partially)

Present claims 30, 41-43, 44, 45, 46, 71 relate to a compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely to be a selective binding agent or an antagonist to the Fhm polypeptide as set out in SEQ ID NO: 4.

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

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 00/21284

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9923105 A	14-05-1999	AU 1450099 A	24-05-1999
		EP 1042343 A	11-10-2000
WO 9614328 A	17-05-1996	AU 708972 B	19-08-1999
		AU 1254795 A	31-05-1996
		EP 0792278 A	03-09-1997
		JP 10509030 T	08-09-1998
		NZ 277354 A	25-02-1999
WO 0008139 A	17-02-2000	AU 2593499 A	28-02-2000

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)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 5
48/00		19/02	4 C 0 8 6
A 6 1 P 7/00		29/00	1 0 1 4 H 0 4 5
19/02		31/00	
29/00	1 0 1	31/12	
31/00		35/00	
31/12		37/02	
35/00		43/00	1 0 5
37/02		C 0 7 K 14/47	
43/00	1 0 5	16/18	
C 0 7 K 14/47		16/46	
16/18		17/02	
16/46		19/00	
17/02		C 1 2 N 1/15	
19/00		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	
1/21		C 1 2 Q 1/02	
5/10		G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 P 21/02			Z
C 1 2 Q 1/02		33/566	
G 0 1 N 33/53		C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		5/00	A
// C 1 2 P 21/08			B
		A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 ウッデン, スコット ケネス
アメリカ合衆国 カリフォルニア, サウ
ザンド オークス, スイート ブライア
ー プレイス 1668

(72)発明者 ボイル, ウィリアム ジェイムズ
アメリカ合衆国 カリフォルニア, ムー
アパーク, チェスナット リッジ スト
リート 11678

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04
DA06 EA04 GA03 GA11 HA01
HA12 HA15 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ20
QQ42 QQ52 QR56 QR59 QR62
QR77 QR80 QR82 QS24 QS25
QS34
4B064 AG01 AG27 AG31 CA02 CA10
CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA91X AA92X AA93Y
AB01 AB04 AC14 BA02 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17
BA01 BA08 BA22 BA23 MA01
NA14 ZA512 ZA962 ZB072
ZB152 ZB212 ZB262 ZB322
ZB332
4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 EE01
GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
MA01 MA04 NA14 ZA51 ZA96
ZB07 ZB15 ZB21 ZB26 ZB32
ZB33
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
BA41 CA40 DA76 DA86 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	TNF配体超基因家族的新成员, Fhm		
公开(公告)号	JP2003506088A	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2001515835	申请日	2000-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司 Synergen		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	スーハイリン ウッデンスコットケネス ボイルウィリアムジェイムズ		
发明人	スー, ハイリン ウッデン, スコット ケネス ボイル, ウィリアム ジェイムズ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P7/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/47 C07K14 /705 C07K16/18 C07K16/46 C07K17/02 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15 /09 C12N15/28 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61K39/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 C07K14/70575 C12N2799/021 Y02A50/412 Y02A50/58		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P7/00 A61P19/02 A61P29/00. 101 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K17/02 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/53.M G01N33 /53.Z G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR56 4B063/QR59 4B063 /QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065 /AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084 /BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB152 4C084 /ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZB332 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085 /DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB15 4C086 /ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB32 4C086/ZB33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045 /FA72 4H045/FA74		
优先权	60/147294 1999-08-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了纯化的多核苷酸, 其编码属于TNF基因超家族的称为Fhm的新型多肽; 纯化的Fhm多肽分子; 与Fhm结合的抗体; 含有该分子的物质。 以及使用这种分子的方法。 本发明的分离的核酸分子包括, 例如, (a) SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列;

