

(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 - 533968

(P2003 - 533968A)

(43)公表日 平成15年11月18日(2003.11.18)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/395	D 4 B 0 2 4
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330数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 522388(P2001 - 522388)

(86) (22)出願日 平成12年8月29日(2000.8.29)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月28日(2002.2.28)

(86)国際出願番号 PCT/US00/23662

(87)国際公開番号 W001/018176

(87)国際公開日 平成13年3月15日(2001.3.15)

(31)優先権主張番号 60/152,248

(32)優先日 平成11年9月3日(1999.9.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ヒューマン ジノーム サイエンスーズ,
インコーポレイテッド

HUMAN GENOME SCIEN
CES, INC.

アメリカ合衆国 メリーランド 20850,ロ
ックビル, キー ウェスト アベニュー
9410

(72)発明者 ヤング, ポール イー.

アメリカ合衆国 メリーランド 20878,
ゲイザースバーグ, ベックウィズ ストリ
ート 122

(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫グロブリンスーパーファミリーポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体

(57)【要約】

本発明は、新規な I g S F ポリペプチドおよびそのよう
なポリペプチドをコードする遺伝子のコード領域を含む
単離された核酸に関する。また、ベクター、宿主細胞、
抗体および I g S F ポリペプチドを産生するための組換
え方法が提供される。本発明はさらに、これらの新規な
I g S F ポリペプチドに関する障害を診断および処置す
るために有用な診断方法および治療方法に関する。本発
明は、被験体における病理学的状態、または病理学的状
態に対する感受性を診断する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号Xに示されるポリヌクレオチド、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNAによってコードされるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号Yの生物学的に活性なポリペプチドフラグメント、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNA配列によってコードされる生物学的に活性なポリペプチドフラグメントをコードする、ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号Yのポリペプチドエピトープ、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNA配列によってコードされるポリペプチドエピトープをコードする、ポリヌクレオチド；

(d) (a)～(c)において特定されるポリヌクレオチドのいずれか1つにストリンジент条件下でハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、ここで、該ポリヌクレオチドは、A残基のみまたはT残基のみのヌクレオチド配列を有する核酸分子に、ストリンジент条件下でハイブリダイズしない、ポリヌクレオチド、

からなる群より選択されるポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

【請求項2】 前記ポリヌクレオチドが、可溶性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項3】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号Yとして同定される配列をコードするヌクレオチド配列、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNA配列によってコード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、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項4】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号Xの全体のヌクレオチド配列、またはATCC受託番号Zに含まれるcDNAを含む、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項5】 前記ポリヌクレオチドがDNAである、請求項2に記載の単離された核酸分子。

【請求項6】 前記ポリヌクレオチドがRNAである、請求項3に記載の単離された核酸分子。

【請求項7】 請求項1に記載の単離された核酸分子を含む、ベクター。

【請求項8】 請求項7に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項9】 遺伝子発現を制御する異種調節エレメントに作動可能に連結されている請求項1に記載の核酸分子を含む、組換え宿主細胞。

【請求項10】 請求項9に記載の宿主細胞からコードされたポリペプチドを発現する工程、および該ポリペプチドを回収する工程を包含する、ポリペプチドの産生方法。

【請求項11】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号Yに示されるポリペプチド、またはcDNAによってコードされるポリペプチド；

(b) 配列番号Yのポリペプチドフラグメント、またはcDNAによってコードされるポリペプチド；

(c) 配列番号Yのポリペプチドエピトープ、またはcDNAによってコードされるポリペプチド；および

(d) 配列番号Yの改変体、
からなる群より選択される配列に少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、
単離されたポリペプチド。

【請求項12】 配列番号Yを有するポリペプチドを含む、請求項11に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項13】 請求項11に記載の単離されたポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項14】 請求項11に記載の単離されたポリペプチドを発現する、
組換え宿主細胞。

【請求項15】 単離されたポリペプチドを作製する方法であって、以下：

(a) 該ポリペプチドが発現されるような条件下で、請求項14に記載の組換え宿主細胞を培養する工程；および

(b) 該ポリペプチドを回収する工程、
を包含する、方法。

【請求項16】 請求項15に記載の方法によって産生される、ポリペプチ

ド。

【請求項17】 医学的状态を予防、処置、または緩和する方法であって、請求項11に記載のポリペプチドまたは請求項1に記載のポリヌクレオチドの治療有効量を、哺乳動物被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項18】 被験体における病理学的状态、または病理学的状态に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 請求項1に記載のポリヌクレオチドにおける変異の存在または非存在を決定する工程；および

(b) 該変異の存在または非存在に基づいて病理学的状态、または病理学的状态に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

【請求項19】 被験体において病理学的状态、または病理学的状态に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) 生物学的サンプルにおける請求項11に記載のポリペプチドの発現の存在または量を決定する工程；および

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

【請求項20】 請求項11に記載のポリペプチドに対する結合パートナーを同定する方法であって、以下：

(a) 請求項11に記載のポリペプチドを結合パートナーと接触させる工程；および

(b) 該結合パートナーが該ポリペプチドの活性をもたらすか否かを決定する工程、を包含する、方法。

【請求項21】 請求項11に記載のポリペプチドの活性を改変する分子をスクリーニングする方法であって、以下：

(a) 該ポリペプチドを、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有すると疑われる化合物と接触させる工程；および

(a) 該ポリペプチドの活性をアッセイする工程；
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、新規の免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)タンパク質に関する。より特定には、新規IgSFポリペプチドをコードする単離された核酸分子が提供される。新規IgSFポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに結合する抗体が提供される。ヒトIgSFポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドを産生するためのベクター、宿主細胞ならびに組換え法および合成法もまた提供される。本発明はさらに、これらの新規IgSFポリペプチドに関する障害を診断、処置、予防、および/または予測するために有用な診断法および治療法に関する。本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニング法に関する。本発明はさらに、本発明のポリペプチドの産生および機能を阻害するための方法および/または組成物に関する。

【0002】**(発明の背景)**

免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)のタンパク質は、細胞-細胞相互作用、細胞表面認識、細胞間連絡ならびに免疫応答および炎症性応答に関するタンパク質の広範なファミリーからなる。このスーパーファミリーのタンパク質のメンバーは、例えば、細胞接着分子(CAM)、CD4、CD8、CD28、CD3、およびT細胞レセプターのような分子を含む。

【0003】

神経系CAMは、軸索の増殖およびガイダンスにおいて重要な役割を担うと考えられる。細胞間接着分子(ICAM)、血管接着分子-1(VCAM-1)、および粘液アドレシン(addressin)細胞接着分子-1(MAdCAM-1)は全て、白血球表面のインテグリンとの結合に関与し、従って感染および障害に対する免疫応答を促進すると考えられる(Wang, J., およびT. A. Springer, Immun. Reviews, 163: 197-215 (1998))。

【0004】

I g S F タンパク質は、抗体の可変ドメインまたは定常ドメインと類似する配列のドメインを共有する分子として規定される。多くのI g S F タンパク質は、F n - I I I リピートドメイン (Vaughn, D. E., およびP. J. Bjorkman, Neuron, 16: 261 - 273 (1996)) のような他のドメインに連結した、多様なタンデムI g 様ドメインからなる。

【0005】

1次構造レベルで、古典的I g 様ドメインは、約55 ~ 75アミノ酸残基によって反復される2つのシステイン残基、およびこれらの2つの保存されたシステイン残基の1つ目のC末端側10 ~ 15残基に位置する1つの「不変な」トリプトファン残基の存在によって同定され得る。これらの2つの保存されたシステイン残基は、フォールディングされたI g 構造を形成するためのジスフィルド結合に関与すると考えられる (Vaughn, D. E., (1996))。

【0006】

I g 様ドメインはさらに、共通のフォールディングパターンを共有する。これは、5 ~ 10アミノ酸を含む逆平行鎖からなる2つのシートのサンドウィッチ構造またはフォールディング構造である (Huang, Z.ら、Biopolymers, 43: 367 - 82 (1997))。I g 様ドメインは、配列類似性および構造類似性に基づいて、C1ドメイン、C2ドメイン、IドメインおよびV様ドメインとして公知の4つのクラスに分割される。C1 (または定常) ドメインは、ジスフィルド結合によって連結された2つの逆平行シートに配置された7つの鎖からなる。C1ドメインは、代表的には、抗体、T細胞レセプターおよびMHC分子に見出される (Wang, J., (1998))。

【0007】

C2ドメインがC1ドメインに見られるバレルのN末端で保存された配列パターンの多くを欠失する以外は、C2ドメインは、C1ドメインに構造的に類似する。C2ドメインは、代表的には接着分子に見出される (Wang, J., (1998))。V様ドメインがさらなる2つの鎖を含む以外は、V様ドメインはまた、C1ドメインに構造的に類似する。V様ドメインは、最大のI g 様ドメ

インでもある。IドメインはV様ドメインとCドメインとの間の中間的トポロジーを有し、筋肉タンパク質に見出される (Vaughn, D. E. (1996))。

【0008】

Ig様ドメインの機能的決定基は、シートの表面またはIgフォールディングのループ領域に存在する。従って、タンパク質-タンパク質相互作用は、シートの表面の間かまたはIgフォールディングのループ領域の間かのいずれかに生じ得る (Huang, Z. (1998))。3つのIg様ドメインは、多様な生物学的機能 (例えば、分子間結合およびタンパク質-タンパク質同種相互作用または異種相互作用) の媒介に関与する。従って、Ig様ドメインは、IgSFタンパク質の活性を促進するために必須の役割を担う。

【0009】

従って、免疫グロブリンスーパーファミリーのタンパク質の新規メンバーを同定かつ開拓することが明らかに必要である。構造的に関連するが、このようなタンパク質は、種々の細胞型および組織型において多様かつ多面的な機能を有し得る。免疫グロブリンタンパク質は、本発明の免疫グロブリンタンパク質の活性に対するアゴニストおよび/またはアンタゴニストとして機能する、低分子および他のこのような薬理的に貴重な因子についての標的ベースのスクリーニングにおける有用性を改善すべきである。本発明の精製された免疫グロブリンタンパク質は、さらなる相互作用タンパク質またはレセプタータンパク質、あるいは、本発明の免疫グロブリンタンパク質と相互作用する他のシグナル伝達経路タンパク質の同定、特徴付けおよび精製に有用である研究道具である。さらに、免疫グロブリンタンパク質の発現をモニターするように設計されたアッセイは、特定の型の疾患 (例えば、神経系疾患) の存在または進行をモニターするための診断道具として有用であり得る。

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、配列表に開示されたおよび/または表1に記載されかつAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託

されたヒトcDNAプラスミドに含まれるポリヌクレオチド配列を含むか、あるいはこれらからなる単離された核酸分子を含む。これらの核酸分子のフラグメント、改変体および誘導体はまた、本発明によって含まれる。本発明はまた、IgSFポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むかあるいはこれらからなる単離された核酸分子を含む。本発明はさらに、これらのポリヌクレオチドによってコードされるIgSFポリペプチドを含む。配列表に開示されたおよび/または表1に記載されかつATCCに寄託されたヒトcDNAプラスミドによってコードされるIgSFポリペプチドを含むか、あるいはこれらからなるアミノ酸配列をさらに提供する。これらのポリペプチドに結合する抗体もまた、本発明によって含まれる。これらのアミノ酸配列のポリペプチドフラグメント、改変体および誘導体はまた、これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびこれらのポリペプチドに結合する抗体と同様に、本発明によって含まれる。

【0011】

(詳細な説明)

(表)

表1は、本発明に関するATCC寄託物、ATCC寄託日、およびATCCで作製された寄託物の受託番号を要約する。表1はさらに、cDNAクローン識別因子、このcDNAクローン識別因子に含まれるベクターの型、ヌクレオチド配列識別因子番号、開示された配列に含まれるヌクレオチド、開示された配列の開始コドンの5'ヌクレオチドの位置、アミノ酸配列識別因子の番号、および開示された配列によってコードされるORFの最終アミノ酸を含む、以下に記載の各々の「遺伝子番号」に関する情報を要約する。

【0012】

表2は、公開ESTを示し、これらの公開EST配列のいずれか1つ以上の少なくとも1、2、3、4、5、10以上は本発明の特定の実施形態から任意に抽出される。

【0013】

表3は、表1に開示されるクローンに対応するポリヌクレオチドの発現プロフィールを要約する。第1列は、独特のクローン識別因子を提供し、cDNAクロ

ーンについての「クローンID番号：Z」は、表1に開示された各々のコンティグ(contig)配列に関する。欄(column)2の「ライブラリーコード」は、本発明のポリヌクレオチドを発現する組織および/または細胞株のライブラリーの発現プロフィールを示す。欄2の各々のライブラリーコードは、表5に提供されるライブラリーコードおよびライブラリーの記載に対応する組織/細胞の供給源識別因子コードを示す。これらのポリヌクレオチドの発現は、試験された他の組織および/または細胞のライブラリーでは観察されなかった。当業者は、対応する本発明のポリヌクレオチドの優位な発現パターンを示す組織を同定するためにか、または優位なおよび/または特異的な組織発現を示すポリヌクレオチドを同定するためにこの情報を通常使用し得た。

【0014】

表4欄1は、表1欄5に開示されるヌクレオチド配列番号Xに一致するヌクレオチド配列識別因子「配列番号X」を提供する。表4欄2は、染色体位置である、配列番号Xに対応するポリヌクレオチドの「細胞学的(cytologic)バンドまたは染色体」を提供する。染色体位置は、ESTおよびNCBI(National Center for Biotechnology Information)のUniGeneデータベースに含まれるcDNA配列に非常に一致することを見出すことによって決定された。推定の染色体位置が得られると、疾患の座関連は、Online Mendelian Inheritance in Man(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™)、McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University(Baltimore, MD)およびNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine(Bethesda, MD)2000、World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>)由来のMorbid Mapと比較することによって決定された。Queryの優位な染色体位置がMorbid Mapエントリーの染色体位置と重複した場合

、Morbid MapエントリーのOMIM参考同定番号は、表4欄3に提供され「OMIM ID」と記された。OMIM参考同定番号の鍵は、表6に提供される。

【0015】

表5欄1は、表3欄2に開示されるライブラリーコードを提供する。欄2は、対応するライブラリーが由来する組織または細胞の供給源の記載を提供する。

【0016】

表6は、表4欄3に開示されるOMIM参考同定番号の鍵を提供する。OMIM参考同定番号(欄1)は、Online Mendelian Inheritance in Man(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™)、McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University(Baltimore, MD)およびNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine(Bethesda, MD)2000、World Wide Web URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>由来であった。欄2は、Morbid Mapデータベースから決定されるように、表4欄2に開示されるサイトロジックなバンドと関連した疾患を提供する。

【0017】

(規定)

以下の規定は、本明細書を通じて使用される特定の用語の理解を容易にするために提供される。

【0018】

本発明において、「単離された(単離される)」は、その元々の環境(例えば、天然に存在する場合、天然の環境)から除去された物質をいう。従って、その天然の状態から「ヒトの手によって」改変される。例えば、単離されたポリヌクレオチドは、ベクターもしくは組成物の様式の一部であり得るか、または細胞内

に含まれ得、そしてなお「単離される」。なぜなら、ベクター、組成物の様式、または特定の細胞は、ポリヌクレオチドの元々の環境ではないからである。用語「単離された(単離される)」は、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリー、全細胞の総調製物、もしくはmRNA調製物、ゲノムDNA調製物(電気泳動によって分離され、そしてプロットに転写されたものを含む)を言及せず、全細胞ゲノムDNA調製物または他の組成物を共有する。ここで、本発明のポリヌクレオチド/配列を区別する特性を当業者は何も示さない。

【0019】

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」は、配列番号X(表1の欄5に記載されるような)またはcDNAプラスミドZ(表1の欄3に記載されるかもしくはATCCに寄託されたプラスミドのプール内に含まれるような)に含まれる核酸配列を有する分子をいう。例えば、ポリヌクレオチドは、5'非転写配列および3'非転写配列、天然または人為的なシグナル配列を伴うかまたは伴わないコード領域、タンパク質コード領域、ならびにこの核酸配列のフラグメント、エピトープ、ドメイン、および改変体を含む全長のcDNA配列のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」とは、広く定義される本発明のポリヌクレオチド(cDNAに対応する配列のポリAテールの翻訳から生じるポリフェニルアラニンペプチド配列もポリリジンペプチド配列も明らかに除く)によってコードされるアミノ酸配列を有する分子をいう。

【0020】

本発明では、配列番号Xの配列を含む代表的プラスミドが、American Type Culture Collection(「ATCC」)に寄託され、そして/または表1に記載されている。表1に示すように、各プラスミドは、cDNAクローンID(識別番号)およびATCC受託番号(ATCC受託番号Z)によって同定される。単一の寄託物としてプールし寄託したプラスミドは、同じATCC受託番号を有する。ATCCは、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USAに位置する。ATCC寄託は、特許手続上の微生物の寄託の

国際的承認に関するブダペスト条約の条項に拠って行われた。

【0021】

本発明の「ポリヌクレオチド」はまた、ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号Xに含まれる配列、またはその相補体（例えば、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドフラグメントのうちのいずれか1つ、2つ、3つ、4つ以上の相補体）、および/またはcDNAプラスミドZに含まれる配列（例えば、本明細書中に記載されるポリヌクレオチドフラグメントのうちのいずれか1つ、2つ、3つ、4つ以上の相補体）にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドを含む。「ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件」とは、50%ホルムアミド、5×SSC（750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸、および20μg/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での42℃で一晩のインキュベーション、続いて0.1×SSC中で約65℃にてフィルターを洗浄することをいう。

【0022】

本発明の「ポリヌクレオチド」には、より低いストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた含まれる。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーおよびシグナル検出の変更は、主として、ホルムアミド濃度（より低い百分率のホルムアミドが、低下したストリンジエンシーを生じる）；塩条件、または温度の操作を通じて達成される。例えば、より低いストリンジエンシー条件は、6×SSPE（20×SSPE = 3M NaCl；0.2M NaH₂PO₄；0.02M EDTA、pH7.4）、0.5% SDS、30%ホルムアミド、100μg/mlサケ精子ブロッキングDNAを含む溶液中、37℃で一晩のインキュベーション；次いで1×SSPE、0.1% SDSを用いた50℃での洗浄を含む。さらに、さらにより低いストリンジエンシーを達成するために、ストリンジेंटなハイブリダイゼーション後に行われる洗浄は、より高い塩濃度（例えば、5×SSC）で行われ得る。

【0023】

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

【0024】

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

【0025】

本発明のポリヌクレオチドは、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得、これは、非改変RNAもしくは非改変DNAまたは改変RNAもしくは改変DNAであり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるRNA、一本鎖、またはより代表的には二本鎖もしくは一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、このポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む、三本鎖領域から構成され得る。ポリヌクレオチドはまた、安定性のために、または他の理由のために改変された、1つ以上の改変された塩基またはDNA骨格もしくはRNA骨格を含み得る。「改変された」塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような普通でない塩基が挙げられる。種々の改変が、DNAおよびRNAに対して行われ得；

したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的に改変された形態を含む。

【0026】

特定の実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも15の、少なくとも30の、少なくとも50の、少なくとも100の、少なくとも125の、少なくとも500の、または少なくとも1000の連続するヌクレオチドであるが、300kb以下、200kb以下、100kb以下、50kb以下、15kb以下、10kb以下、7.5kb以下、5kb以下、2.5kb以下、2.0kb以下、または1kb以下の長さである。さらなる実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書中に開示されたコード配列の一部を含むが、任意のイントロンの全てまたは一部を含むわけではない。別の実施形態においては、コード配列を含むポリヌクレオチドは、ゲノムの隣接遺伝子のコード配列（すなわち、ゲノムにおける目的の遺伝子に対する5'または3'）を含まない。他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、1000、500、250、100、50、25、20、15、10、5、4、3、2または1以上のゲノム隣接遺伝子のコード配列を含まない。

【0027】

「配列番号X」とは、表1のカラム5に記載されるポリヌクレオチド配列をいうが、「配列番号Y」とは、表1のカラム10に記載されるポリペプチド配列をいう。配列番号Xは、表1のカラム6において特定される整数によって同定される。配列番号Yのポリペプチド配列は、配列番号Xのポリヌクレオチドによってコードされる翻訳されたオープンリーディングフレーム（ORF）である。ポリヌクレオチド配列は、配列リストに示され、直ちに全てのポリペプチド配列が続く。従って、配列番号2のポリヌクレオチド配列に対応するポリペプチド配列は、配列リストに示される第1のポリペプチド配列である。第2のポリペプチド配列は、配列番号3として示されるポリヌクレオチド配列に対応する、など。

【0028】

本発明のポリペプチドは、ペプチド結合または改変されたペプチド結合、すなわち、ペプチドアイソスター（*isostere*）によって互いに連結したアミ

ノ酸から構成され得、そして遺伝子がコードする20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングのような天然のプロセスによって、または当該技術分野で周知の化学的改変技術のいずれかによって、改変され得る。このような改変は、基本的なテキスト、およびより詳細な研究論文、ならびに多くの研究文献に十分に記載される。改変は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端またはカルボキシル末端、を含むポリペプチドのどこにでも生じ得る。同じ型の改変が、所定のポリペプチド中のいくつかの部位で、同じまたは種々の程度で存在し得ることが理解される。また、所定のポリペプチドは多くの型の改変を含み得る。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝状であり得、そしてそのポリペプチドは、分枝を含むかまたは含まない、環状であり得る。環状、分枝状および分枝した環状のポリペプチドは、天然の翻訳後プロセスから生じ得るか、または合成方法によって作製され得る。改変としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol) の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、水酸化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化 (pegylation)、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸のトランスファー-RNA媒介付加、およびユビキチン化が挙げられる。(例えば、PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES、第2版、T. E. Creighton、W. H. Freeman and Company、New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS、B. C. Johnson編、Academic Press、New York、1-12頁(1983); Seifterら、Meth Enzymol. 182: 626-646 (1990); Rattanら、Ann.

N. Y. Acad. Sci. 663: 48 - 62 (1992)を参照のこと)。

【0029】

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

【0030】

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

【0031】

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

【0032】

「機能的活性」を示すポリペプチドとは、本発明の全長(完全)タンパク質と関連した1つ以上の公知の機能的活性を示し得るポリペプチドを意味する。このような機能的活性としては、生物学的活性、抗原性[抗ポリペプチド抗体に結合

する（または結合することについて、ポリペプチドと競合する）能力]、免疫原性（本発明の特定のポリペプチドに結合する抗体を生成する能力）、本発明のポリペプチドと多量体を形成する能力、およびポリペプチドについてのレセプターまたはリガンドに結合する能力が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

「機能的活性を有するポリペプチド」とは、特定のアッセイ（例えば、生物学的アッセイのような）で測定した場合、用量依存性を伴っても伴わなくても、本発明のポリペプチド（成熟形態を含む）の活性と類似であるが、必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいう。用量依存性が存在する場合、ポリペプチドの用量依存性と同一である必要はないが、むしろ本発明のポリペプチドと比較した場合に、所定の活性における用量依存性に実質的に類似する（すなわち、候補ポリペプチドは、本発明のポリペプチドと比較して、より大きな活性を示すか、または約1/25以下、そして好ましくは約1/10以下の活性、そして最も好ましくは約1/3以下の活性を示す）。

【0034】

ポリペプチド、ならびにそれらのフラグメント、改変体、誘導體、およびアナログの機能的活性は、種々の方法によってアッセイされ得る。

【0035】

例えば、全長ポリペプチドに対する抗体への結合について本発明の全長ポリペプチドに結合するか、またはそれと競合する能力についてアッセイする、1つの実施形態では、当該分野で公知の種々の免疫アッセイが、用いられ得る。このようなアッセイとしては、放射免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫放射分析アッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュ免疫アッセイ（例えば、コロイド金、酵素または放射性同位体標識を用いる）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ）、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどのような技術を用いる競合および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態では、抗体結合が、一次抗体上の標識を検出すること

によって検出される。別の実施形態では、この一次抗体は、この一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態では、この二次抗体が標識される。多くの手段が、免疫アッセイにおける結合の検出について当該分野で公知であり、そして本発明の範囲内である。

【0036】

別の実施形態では、リガンドが同定される場合、または本発明のポリペプチドフラグメント、改変体、または誘導体が多量体化する能力が評価される場合、結合が、例えば、還元および非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、ならびにアフィニティープロットングのような当該分野で周知の手段によって、アッセイされ得る。一般には、Phizicky、E.ら、Microbiol. Rev. 59:94-123(1995)を参照のこと。別の実施形態では、その基質への本発明のポリペプチドの結合の生理学的相関(シグナル伝達)がアッセイされ得る。

【0037】

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

【0038】

(本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド)

(遺伝子番号1によってコードされるタンパク質の特徴)

この遺伝子に対応する翻訳産物は、抗体の抗原決定基に関与すると考えられる、IgG 軽鎖タンパク質(Genbank登録番号JE0241)と配列同一性を共有する。

【0039】

本発明の翻訳産物をコードする遺伝子は、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーのタンパク質のメンバーである。これらの分子は、Ig様ドメインを含

む、このドメインは、抗体の可変ドメインまたは定常ドメインに対する配列類似性に基いてその名前が由来している。伝統的なIg様ドメインは、Vaughanら(前出)によって規定されるように、第1の保存システインに対して10~15アミノ酸C末端に位置する不変のトリプトファン残基を伴う、55~75アミノ酸残基によって隔てられる2つのシステインから構成される。好ましいIg様ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列：CLLNPFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号14)を含むか、あるいはこのアミノ酸配列から構成される。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体(例えば、本明細書に記載のフラグメントおよび/または改変体など)は本発明によって包含される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(フラグメントおよび/または改変体を含む)がまた、これらのポリペプチドに結合する抗体がそうであるように、本発明によって包含される。配列番号14のIg様ドメイン、および配列番号8の少なくとも5、10、15、20、25、30、50または75のさらなる連続するアミノ酸残基を含むポリペプチドがさらに好ましい。さらなる連続するアミノ酸残基は、Ig様ドメインのN末端またはC末端であり得る。あるいは、さらなる連続するアミノ酸残基は、Ig様ドメインのN末端およびC末端の両方であり得る。ここで、N末端およびC末端の連続するアミノ酸残基の総数は、特定の数に等しい。

【0040】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号8において残基：Ser-52~Tyr-58、Gln-63~Pro-70、Thr-79~Gly-90、Tyr-118~Gln-126、Pro-146~Gly-154、Gly-183~Tyr-199、Lys-209~His-215、およびLys-233~Cys-240として示される免疫原性エピートプのうち1、2、3、4、5、6、7、8または8つ全てを含むか、あるいはこのようなエピートプから構成される。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体(例えば、本明細書に記載されるようなフラグメント、および/または改変体など)が、

本発明によって包含される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび/または改変体を含む）がまた、これらのポリペプチドに結合する抗体がそうであるように、本発明によって包含される。

【0041】

この遺伝子は、拒絶腎臓組織において発現される。

【0042】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド（抗体を含む）は、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：器官拒絶、および免疫系の疾患および/または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に腎臓系および免疫系の多くの障害に関連して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いまたはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、腎臓組織、免疫組織、移植器官、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液、および髄液）、またはこのような障害を有する個体から得られた別の組織もしくは細胞サンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【0043】

拒絶腎臓組織における組織分布、I g G 軽鎖タンパク質に対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよびポリペプチドが、器官移植の拒絶の処置のために、または他の腎臓障害（例えば、腎症）の検出、診断および/または処置に有用であることを示す。

【0044】

実際、McDonaldらは、腎症を有する患者の尿中で、および器官不全または拒絶の初期徴候を示している腎臓移植患者において、見出された新規な免疫グロブリン様糖タンパク質を記載している（本明細書において参考として援用される、米国特許第5,654,158号を参照のこと）。McDonaldらは

、このタンパク質が、正常なヒトIgG分子に同一のいくつかの抗原性エピートープを含むと述べている。従って、このクローンに対応する翻訳産物は、類似の様式で機能し得、そして腎臓移植拒絶または腎不全の初期指標として役立つ。従って、この遺伝子の翻訳産物の一部に特異的に結合する、抗体または低分子が好ましい。また腎臓拒絶および/または腎臓を検出するためのキットが提供される。このようなキットは、1つの実施形態において、固体支持体に結合したこの遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体を含む。また個体において腎臓拒絶および/または腎臓を検出する方法が提供される。この方法は、この遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体をこの個体由来の体液（好ましくは血清）に接触させる工程、およびこの体液中で見出された抗原に抗体が結合するか否かを確認する工程を含む。好ましくは、この抗体は、固体支持体に結合され、そして体液は血清である。上記の実施形態、ならびに他の処置および診断試験（キットおよび方法）は、本明細書の他のいずれかにおいてより詳細に記載される。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物およびこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に列挙した組織についての腫瘍マーカーおよび/または免疫療法の標的としての有用性を示し得る。

【0045】

（遺伝子番号2によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子に対応する翻訳産物は、*Drosophila*の皺（*furrowed*）（*fw*）遺伝子と配相同性を共有する（Genbank登録番号AAB36703を参照のこと）。皺遺伝子（*furrowed gene*）の変異は、眼および機械的感覚の剛毛の発達における欠損を生じる。

【0046】

本発明の翻訳産物をコードする遺伝子は、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーのタンパク質のメンバーである。これらの分子は、Ig様ドメインを含む、このドメインは、抗体の可変ドメインまたは定常ドメインに対する配列類似性に基いてその名前が由来している。伝統的なIg様ドメインは、Vaughanら（前出）によって規定されるように、第1の保存システインに対して10～15アミノ酸C末端に位置する不変のトリプトファン残基を伴う、55～75アミノ酸残基によって隔てられる2つのシステインから構成される。好ましいIg

様ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列：CTRHPQGYHLWSEAIPLCQALSCGLPEAPKNGMVFGKEYTVGTKAVYSC（配列番号15）を含むか、あるいはこのアミノ酸配列から構成される。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体（例えば、本明細書に記載のフラグメントおよび/または改変体など）は本発明によって包含される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび/または改変体を含む）がまた、これらのポリペプチドに結合する抗体がそうであるように、本発明によって包含される。配列番号15のIg様ドメイン、および配列番号9の少なくとも5、10、15、20、25、30、50または75のさらなる連続するアミノ酸残基を含むポリペプチドがさらに好ましい。さらなる連続するアミノ酸残基は、Ig様ドメインのN末端またはC末端であり得る。あるいは、さらなる連続するアミノ酸残基は、Ig様ドメインのN末端およびC末端の両方であり得る。ここで、N末端およびC末端の連続するアミノ酸残基の総数は、特定の数に等しい。

【0047】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号9において残基：Arg-6~Tyr-11、Leu-73~Val-79、Pro-121~Gly-127、Leu-141~Pro-146、Asn-223~Arg-230、Gln-253~Lys-260、Thr-328~Ser-336、Gly-374~Pro-383、His-392~Asp-404、Arg-484~Ser-500、Asn-511~Asn-517、Ser-577~Cys-583、およびAsn-605~Asn-610として示される免疫原性エピトープのうち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または13全てを含むか、あるいはこのようなエピトープから構成される。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体（例えば、本明細書に記載されるようなフラグメント、および/または改変体など）が、本発明によって包含される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび/または改変体を含む）がまた、これらのポリペプチドに結合する抗体がそうであるように、本発明によって包含される。

【0048】

この遺伝子は、膵臓腫瘍組織、成体精巣、および扁桃組織において発現される。

【0049】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド（抗体を含む）は、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下：膵臓腫瘍、免疫系および生殖系の疾患および/または障害を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に生殖系および免疫系の多くの障害に関連して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いまたはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、生殖組織、膵臓組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液、および髄液）、またはこのような障害を有する個体から得られた別の組織もしくは細胞サンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【0050】

膵臓腫瘍組織、精巣組織および扁桃における組織分布、ならびに *Drosophila* の皺遺伝子に対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体が、膵臓腫瘍の診断、検出および/または処置のため、ならびに生殖系および免疫系の疾患および/または障害の診断、検出および/または処置に有用であることを示す。

【0051】

膵臓腫瘍組織における組織分布は、この遺伝子が、同属のリガンドによってレセプターの結合をブロックする、アンタゴニスト（特に低分子または抗体）の良好な標的であることを示す。従って、この遺伝子の翻訳産物の一部に特異的に結合する、抗体または低分子が好ましい。また膵臓癌を検出するためのキットが提供される。このようなキットは、1つの実施形態において、固体支持体に結合し

たこの遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体を含む。また個体において膵臓癌を検出する方法が提供される。この方法は、この遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体をこの個体由来の体液（好ましくは血清）に接触させる工程、およびこの体液中で見出された抗原に抗体が結合するか否かを確認する工程、を包含する。好ましくは、この抗体は、固体支持体に結合され、そして体液は血清である。上記の実施形態、ならびに他の処置および診断試験（キットおよび方法）は、本明細書の他のいずれかにおいてより詳細に記載される。

【0052】

あるいは、精巣における組織分布は、このクローンのタンパク質産物が、適切な精巣機能に関する状態（例えば、内分泌機能、精子成熟）および癌の処置および診断について有用であることを示す。従って、この遺伝子産物は、男性不妊症および/または不能症の処置に有用である。この遺伝子産物はまた、このような因子（アンタゴニスト）が男性避妊薬として有用であるので、結合因子を同定するために設計されるアッセイにおいて有用である。同様に、このタンパク質は、精巣癌の処置および/または診断に有用であると考えられる。精巣はまた、身体の他の組織において特に低レベルで発現され得る転写物の活性な遺伝子発現部位である。従って、この遺伝子産物は、他の特定の組織または器官において発現され得、ここで、これは、他のプロセス（例えば、いくつかの標的指標の可能性を挙げると、造血、炎症、骨形成、および腎機能）において、関連した機能的役割を果たし得る。

【0053】

扁桃におけるこの遺伝子産物の発現はまた、血液幹細胞を含む潜在的に全ての造血細胞系統の増殖、生存、分化、および/または活性化の調節における役割を示唆する。この遺伝子産物は、サイトカインの産生、抗原提示、または癌の処置（例えば、免疫応答を追加免疫することによる）においての有用性もまた示唆し得る他のプロセスの調節に関与し得る。この遺伝子は、リンパ起源の細胞において発現されるので、この遺伝子またはタンパク質、ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に挙げた組織の腫瘍マーカーとしておよび/または免疫治療の標的として有用性を示し得る。従って、これらをまた、関節炎、喘息、AIDS

のような免疫不全疾患、白血病、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、挫瘡、および乾癬を含む免疫学的障害のための薬剤として使用し得る。さらに、この遺伝子産物は、様々な血液系列の幹細胞および方向付けられた前駆細胞の拡大において、および様々な細胞型の分化および/または増殖において商業的有用性を有し得る。タンパク質ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に挙げた組織の腫瘍マーカーとしておよび/または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【0054】

(遺伝子番号3によりコードされるタンパク質の特徴)

この遺伝子に対応する翻訳産物は、多くの 2 - ミクログロブリン分子と配列相同性を共有し、これは、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子の必須のサブユニット (Tリンパ球の抗原性ペプチドを示す (例えば、Genbank 登録番号 AAA16252 を参照のこと)) である。

【0055】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号10において残基: Arg - 31 ~ Asn - 40、Lys - 60 ~ Asp - 71、および Phe - 88 ~ Asp - 94 として示される免疫原性エピトープのうち1、2、3、または3つ全てを含むか、あるいはこのようなエピトープから構成される。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体 (例えば、本明細書中に記載のフラグメントおよび/または改変体) は、本発明により含まれる。これらのポリペプチド (フラグメントおよび/または改変体を含む) をコードするポリヌクレオチドがまた、本発明により包含され、これらのポリペプチドを結合する抗体も同様に包含される。

【0056】

この遺伝子は、ヒト卵巣腫瘍組織において発現される。

【0057】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド (抗体を含む) は、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下; 卵巣の癌ならびに免疫系の疾患および/または障害を含むがそれらに限定さ

れない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に雌性の生殖系および免疫系の多くの障害に関連して、標準の遺伝子発現レベル（すなわち、障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル）に対して有意により高いまたはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、免疫組織、生殖組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）、またはこのような障害を有する個体から得られた別の組織もしくは細胞サンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【0058】

ヒト卵巣腫瘍組織における組織分布、および 2 - ミクログロブリンに対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体が、卵巣癌ならびに免疫系疾患および/または障害の診断、検出、および/または処置に有用であることを示す。

【0059】

卵巣癌組織における組織分布は、この遺伝子が、そのコグネイトリガンドによるレセプターの結合をブロックするアンタゴニスト（特に、低分子または抗体）についての良好な標的であることを示す。従って、この遺伝子の翻訳産物の一部分に特異的に結合する抗体および低分子が好ましい。卵巣癌を検出するためのキットもまた提供される。このようなキットは、1つの実施形態において、固体支持体に結合したこの遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体を含む。個体における卵巣癌を検出する方法もまた提供され、この方法は、この遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体を、この個体に由来する体液（好ましくは、血清）に接触させる工程、および抗体が、この体液中で見出された抗原に結合するか否かを確認する工程を包含する。好ましくは、この抗体は、固体支持体に結合しており、そしてこの体液は、血清である。上記の実施形態、ならびに他の処置および診断試験（キットおよび方法）は、本明細書中他の箇所により具体的に記載される。

【0060】

あるいは、 2 - ミクログロブリンに対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体が免疫系の疾患および/または障害の診断、検出および/または処置に有用であることを示唆する。このクローンに対応する翻訳産物は、リンパ球系統の増殖において役割を果たし得、そして免疫プロセスの間の正常な抗原認識およびT細胞の活性化に関与し得る。さらに、この相同性はまた、免疫機能および免疫サーベイランスにおけるこのタンパク質についての役割を強く示唆し、そして感染および外来物質に対する免疫応答を媒介することに関与し得る。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げた組織の腫瘍マーカーとしておよび/または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【0061】

(遺伝子番号4によりコードされるタンパク質の特徴)

この遺伝子に対応する翻訳産物は、C. elegans由来のSAX-3タンパク質(Genbank登録番号AAC38848)と配列相同性を共有する。このタンパク質は、誘導決定の間の細胞間相互作用を媒介することにおいて重要であると考えられ、このことは、SAX-3タンパク質が、軸索誘導の時点で必要とされることを示唆する。

【0062】

本発明の翻訳産物をコードする遺伝子は、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーのタンパク質のメンバーである。これらの分子は、Ig様ドメインを含み、このドメインは、抗体の可変性ドメインまたは定常ドメインに対する配列類似性に基づいて、それらの名前が由来している。伝統的なIg様ドメインは、55~75アミノ酸残基により分離した2つのシステインからなる。不変のトリプトファンは、Vaughanら(前出)により規定されるように、最初の保存システインに対して10~15アミノ酸C末端に位置している。好ましいIg様ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含むか、あるいはこのアミノ酸配列から構成される:

【0063】

【化1】

CTPPGAGQGRFSWTLPNGMHLEGPQTLGRVSLDNGTLTVREASVFDRGTYVC

(配 列 番 号 16)

CMAMGIPKADITWELPKSHLKAGVQARLYGNRFLHPQGSLLTIQHATQRDAGFYKC

(配列番号 17)

これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体(例えば、本明細書中に記載のポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体)は、本発明により含まれる。これらのポリペプチド(フラグメントおよび/または改変体を含む)をコードするポリヌクレオチドがまた、本発明により包含され、これらのポリペプチドを結合する抗体も同様に包含される。配列番号16および17のIg様ドメインを含むポリペプチドおよび、配列番号11の少なくとも5、10、15、20、25、30、50、または75のさらなる連続するアミノ酸残基がさらに好ましい。このさらなる連続するアミノ酸残基は、Ig様ドメインに対してN末端またはC末端であり得る。あるいは、このさらなる連続するアミノ酸残基は、Ig様ドメインに対してN末端およびC末端の両方であり得る。ここで、N末端およびC末端の連続するアミノ酸残基全体は、特定の番号に等しい。

【0064】

U937骨髄性細胞株に対して試験する場合、この遺伝子を含む細胞から除去された上清は、GASアッセイを活性化した。従って、この遺伝子は、Jak-STATシグナル伝達経路を介して骨髄性細胞を活性化するようである。活性化配列(GAS)は、Jak-STAT経路に関与する多くの遺伝子の上流で見出されるプロモーターエレメントである。このJak-STAT経路は、細胞の分化および増殖に関与する大きなシグナル伝達経路である。従って、GASエレメントの結合によって反映されるJak-STAT経路の活性化は、細胞の増殖および分化に関与するタンパク質を示すために使用され得る。

【0065】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号11において残基:Pro-21~Arg-37、Gly-43~Gln-51、His-62~Leu-78、Pro-125~Gln-130、Pro-150~Phe-157、Pro-

221~Pro-227、Thr-289~Gly-294、およびSer-306~Thr-311として示される免疫原性エピートプのうち1、2、3、4、5、6、7、8または8つ全てを含むか、あるいはこのようなエピートプから構成される。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体(例えば、本明細書中に記載のフラグメントおよび/または改変体)は、本発明により含まれる。これらのポリペプチド(フラグメントおよび/または改変体を含む)をコードするポリヌクレオチドがまた、本発明により包含され、これらのポリペプチドを結合する抗体も同様に包含される。

【0066】

この遺伝子は、主に、樹状細胞および多くの腫瘍組織(卵巣癌、膵臓癌およびホジキンリンパ腫を含む)において発現される。

【0067】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド(抗体を含む)は、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに以下;免疫系の疾患および/または障害、ならびに多くの癌(例えば、卵巣癌および膵臓癌、ならびにホジキンリンパ腫)を含むがそれらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。上記組織または細胞、特に免疫系の障害、および癌の多くの障害に関連して、標準の遺伝子発現レベル(すなわち、障害を有さない個体由来の健常組織または体液中の発現レベル)に対して有意により高いまたはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型(例えば、免疫組織、癌性組織および創傷組織)または体液(例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液)、またはこのような障害を有する個体から得られた別の組織もしくは細胞サンプルの中で、慣用的に検出され得る。

【0068】

生物学的活性データと関連して、初代樹状細胞における組織分布は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体が免疫系の疾患および

／または障害の診断、検出および／または処置に有用であることを示す。

【0069】

初代樹状細胞におけるこの遺伝子産物の発現はまた、免疫機能および免疫サーベイランスにおけるこのタンパク質についての役割を強く示唆する。同様に、初代樹状細胞におけるこの遺伝子産物の発現は、血液幹細胞を含む潜在的に全ての造血細胞系列の増殖；生存；分化；および／または活性化の調節における役割を示唆する。この遺伝子産物は、サイトカイン産生、抗原提示、または癌の処置（例えば、免疫応答をブーストすることによる）における有用性もまた示唆し得る他のプロセスの調節に関与し得る。この遺伝子は、リンパ起源の細胞において発現されるので、この遺伝子またはタンパク質ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記に列挙された組織の腫瘍マーカーおよび／または免疫治療の標的としての有用性を示し得る。従って、これはまた、関節炎、喘息、免疫不全疾患（例えば、AIDS）、白血病、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、挫瘡、および乾癬を含む免疫学的障害のための薬剤として用いられ得る。さらに、この遺伝子産物は、幹細胞および種々の血液系統の方向付けられた前駆細胞の増殖において、ならびに様々な細胞型の分化および／または増殖において商業的有用性を有し得る。

【0070】

あるいは、この遺伝子は、広範に種々の癌性組織において発現され、そして癌性細胞の増殖において役割を果たし得るか、あるいは癌（例えば、卵巣癌および膵臓癌）の存在についての診断マーカーとして働き得る。従って、この遺伝子の翻訳産物の一部分に特異的に結合する抗体および／または低分子が好ましい。このクローンの翻訳産物が発現される癌を検出するためのキットもまた提供される。

このようなキットは、1つの実施形態において、固体支持体に結合したこの遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体を含む。個体におけるこれらの癌を検出する方法もまた提供され、この方法は、この遺伝子の翻訳産物に特異的な抗体を、この個体に由来する体液（好ましくは、血清）に接触させる工程、および抗体が、この体液中で見出された抗原に結合するか否かを確認する工程を包含する。好ましくは

、この抗体は、固体支持体に結合しており、そしてこの体液は、血清である。上記の実施形態、ならびに他の処置および診断試験（キットおよび方法）は、本明細書中他の箇所により具体的に記載される。さらに、この遺伝子に対応する翻訳産物、ならびにこれらの翻訳産物に対する抗体は、上記に挙げた組織の腫瘍マーカーとしておよび/または免疫治療の標的として有用性を示し得る。

【0071】

（遺伝子番号5によりコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子に対応する翻訳産物は、*Fugu rubripes*由来のL1神経細胞接着分子と配列相同性を共有する。この分子は、細胞内シグナル伝達、ならびに軸索成長および束形成のプロセスにおける細胞骨格エレメントとの相互作用に関与すると考えられる（Genbank登録番号CAA96469を参照のこと）。ヒトL1遺伝子における偏位は、4つの関連神経学的障害であるX連鎖水頭症、痙性対麻痺（SPG1）、MASA症候群、およびX連鎖脳梁無発育と関連する。

【0072】

本発明の翻訳産物をコードする遺伝子は、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーのタンパク質のメンバーである。これらの分子は、Ig様ドメインを含み、このドメインは、抗体の可変ドメインまたは定常ドメインに類似する配列に基づくこれらの名前を派生する。従来のIg様ドメインは、55～75アミノ酸残基によって隔てられた2つのシステインからなり、Vaughanら（前出）によって規定されるように、第1の保存システインに対して10～15アミノ酸C末端に位置する不変のトリプトファン残基を有する。好ましいIg様ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を含むか、あるいはこれらからなる：C I A S A R P V E D L S V T W K R N G V R I T S G L H S F G R R L T I S N P T F A D T G P Y V C（配列番号18）およびC Q A M G V P L P T L Q W Y K D A I S I S R L Q N P R Y K V L A S G G L R I Q K L R P E D S G I F Q C（配列番号19）。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体（例えば、本明細書中に記載されるようなフラグメントおよび/または改変体）は、本発明によって含まれる。これらのポリペプチド（フラグメントおよび/または改変

体を含む)をコードするポリヌクレオチドもまた、これらのポリペプチドに結合する抗体と同様に、本発明によって含まれる。さらに好ましいのは、配列番号18および19のIg様ドメイン、ならびに配列番号12の少なくとも5、10、15、20、25、30、50、または75個のさらなる連続アミノ酸残基を含むポリペプチドである。このさらなる連続アミノ酸残基は、Ig様ドメインのN末端またはC末端であり得る。あるいは、このさらなる連続アミノ酸残基は、Ig様ドメインに対してN末端およびC末端の両方であり得、ここで、全N末端およびC末端の連続アミノ酸残基は、特定数に等しい。

【0073】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号12に残基：Arg-139~Tyr-145およびGln-156~Gly-164として示される免疫原性エプトープの1、2または両方を含むか、あるいはこれらからなる。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体(例えば、本明細書中に記載されるようなフラグメントおよび/または改変体)は、本発明によって含まれる。これらのポリペプチド(フラグメントおよび/または改変体を含む)をコードするポリヌクレオチドもまた、これらのポリペプチドに結合する抗体と同様に、本発明によって含まれる。

【0074】

この遺伝子は、滑膜線維芽細胞で発現される。

【0075】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド(抗体を含む)は、生物学的試料中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに神経および筋骨格の疾患および/または障害を含むが、これらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブを提供することに有用である。上記組織または細胞の多くの障害、特に神経系および筋骨格系の多くの障害について、標準的な遺伝子発現レベル、すなわち、障害を有さない個体からの健常組織または体液中の発現レベルに対して有意により高いまたはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害

を有する個体から採取された特定の組織または細胞型（例えば、神経組織、筋骨格組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）または別の組織もしくは細胞試料中で慣用的に検出される。

【0076】

滑膜線維芽細胞における組織分布および神経細胞接着分子L1に対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体が、神経系および筋骨格系の疾患および/または障害の診断、検出および/または処置に有用であることを示す。

【0077】

L1神経細胞接着分子に対する相同性は、このクローンの翻訳産物が、神経系成分の形成を媒介および/または指向することに関与し得ることを示唆する。

【0078】

さらに、このクローンの翻訳産物は、X連鎖水頭症、痙性対麻痺（SPG1）、MASA症候群、およびX連鎖脳梁無発育のような神経障害の、診断、検出および/または処置に有用であり得る。より一般的には、このクローンのタンパク質産物は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、ツレット症候群、精神分裂病、躁病、痴呆、パラノイア、強迫性障害、恐慌性障害、学習障害、ALS、精神病、自閉症、および行動変化（栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚における障害を含む）のような神経変性疾患状態および行動性障害の検出/処置に有用である。

【0079】

さらに、この遺伝子または遺伝子産物はまた、発生胚と関連する発生障害または性連鎖障害の処置および/または検出に役割を果たし得る。あるいは、滑膜線維芽細胞における組織分布は、このクローンの翻訳産物が、筋骨格疾患および/または筋骨格障害（例えば、骨粗鬆症、心臓疾患、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、発作（stroke）、アンギナ、血栓症、および創傷治癒）、ならびに結合組織を冒す障害（例えば、関節炎、外傷、腱炎、慢性軟化症（chondromalacia）および炎症）の診断、検出および/または処置に有用であり、

例えば、種々の自己免疫障害（例えば、慢性関節リウマチ、狼瘡、強皮症、および皮膚筋炎、ならびに小人症、脊髄変形、および特定の関節異常、ならびに軟骨形成不全症（すなわち、先天性脊椎骨端形成異常、家族性関節炎、II型アテロ骨形成（*Atelosteogenesis*）、Schmid型骨幹端軟骨形成不全症）の診断または処置に有用であることを示す。タンパク質ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上記組織に対する腫瘍マーカーおよび/または免疫治療標的としての有用性を示し得る。

【0080】

（遺伝子番号6によってコードされるタンパク質の特徴）

この遺伝子の対応する翻訳産物は、ラット脳cDNAライブラリーから単離された免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリータンパク質のメンバーである、*Rattus norvegicus*由来の糖タンパク質65と配列相同性を共有する（Genbank登録番号CAA67712を参照のこと）。糖タンパク質65は、細胞-細胞（特に、シナプスと神経細胞を含む）接着相互作用に関与すると考えられている。相同性に基づいて、これらのタンパク質が少なくともいくらかの生物学的活性を共有すると考えられる。

【0081】

本発明の好ましいポリペプチドは、配列番号13において残基：Glu-34~Cys-42、Val-74~Asn-92、Arg-114~Pro-124、およびPro-157~Asp-164として示される免疫原性エピトープの1、2、3、4、または4つ全てを含むか、あるいはこれらからなる。これらのポリペプチドのフラグメントおよび/または改変体（例えば、本明細書中に記載されるようなフラグメントおよび/または改変体）は、本発明によって含まれる。これらのポリペプチド（フラグメントおよび/または改変体を含む）をコードするポリヌクレオチドもまた、これらのポリペプチドに結合する抗体と同様に、本発明によって含まれる。

【0082】

この遺伝子は、神経組織、ならびに好中球および胎児の肝臓組織/脾臓組織で発現される。

【0083】

従って、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド（抗体を含む）は、生物学的試料中に存在する組織または細胞型の示差的同定のため、ならびに神経系および免疫系の疾患および/または障害を含むが、これらに限定されない疾患および状態の診断のための試薬として有用である。同様に、ポリペプチドおよびこれらのポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブを提供することに有用である。上記組織または細胞の多くの障害、特に神経系および免疫系の多くの障害について、標準的な遺伝子発現レベル、すなわち、障害を有さない個体からの健常組織または体液中の発現レベルに対して有意により高いまたはより低いレベルのこの遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織または細胞型（例えば、神経組織、免疫組織、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液）または別の組織もしくは細胞試料中で慣用的に検出され得る。

【0084】

神経組織における組織分布および糖タンパク質65に対する相同性は、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体が、神経系疾患および/または神経系障害（例えば、異常な神経細胞生存、異常なシナプス形成、異常なコンダクタンス、異常な神経細胞分化、および/または異常な細胞-細胞間の接着相互作用などを含む）の診断、検出および/または処置に有用であることを示す。

【0085】

より一般的には、このクローンのタンパク質産物は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン病、ツレット症候群、精神分裂病、躁病、痴呆、パラノイア、強迫性障害、恐慌性障害、学習障害、ALS、精神病、自閉症、および行動変化（栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚における障害を含む）のような神経変性疾患状態および行動性障害の検出および/または処置に有用である。

【0086】

あるいは、好中球および胎児肝臓組織 / 胎児脾臓組織における組織分布は、このクローンのタンパク質産物が、種々の免疫系障害の診断および / または処置に有用であることを示唆する。好中球および胎児肝臓組織 / 胎児脾臓組織におけるこの遺伝子産物の発現は、増殖 ; 生存 ; 分化 ; および / または潜在的に全ての造血細胞系列 (血液幹細胞を含む) の活性化の調節における役割を示唆する。この遺伝子産物は、サイトカイン産生、抗原提示、または癌の処置における有用性がまた示唆され得る他のプロセス (例えば、免疫応答をブーストすることによる) の調節に関与し得る。さらに、このタンパク質に対する抗体は、上で列挙された組織に対する腫瘍マーカーおよび / または免疫治療標的としての有用性を示し得る。従って、これはまた、関節炎、喘息、A I D S のような免疫不全疾患、白血病、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症、挫瘡および乾癬を含む免疫学的障害のための薬剤として使用され得る。さらに、この遺伝子産物は、幹細胞および様々な血液系列の方向付けられた前駆細胞の増大において、および種々の細胞型の分化および / または増殖において商業的有用性を有し得る。好中球におけるこの遺伝子産物の発現はまた、このタンパク質の免疫機能および免疫サーベイランスにおける役割を強く示唆する。タンパク質ならびにこのタンパク質に対する抗体は、上で列挙した組織に対する腫瘍マーカーおよび / または免疫治療標的として有用性を示し得る。

【 0 0 8 7 】

【表1】

(表1)

遺伝子 番号	cDNA クローン ID	ATCC 寄託 番号 Z および日付	ベクター	クローン 配列の 5'ヌクレ オチド	総ヌレ オチド 配列	クローン 配列の 5'ヌクレ オチド	クローン 配列の 3'ヌクレ オチド	開始 コドンの 5'ヌクレ オチド	アミノ酸 配列の 番号	ORF の長さ のヌレ オチド
				X					Y	
1	HRACW30	PTA621 09/02/99	pCMVSPORT 3.0	2	1033	1	1033	10	8	240
2	HTPFG82	PTA2330 08/07/00	Uni-ZAP XR	3	2487	1	2487	430	9	613
3	HOFNK31	PTA621 09/02/99	pCMVSPORT 2.0	4	873	1	873		10	117
4	HHPEK94	PTA621 09/02/99	Uni-ZAP XR	5	3040	1092	3040	890	11	316
5	HFIYV36	PTA621 09/02/99	pSport1	6	1753	1	1753	65	12	182
6	HNGCM03	PTA621 09/02/99	Uni-ZAP XR	7	1182	1	1182		13	218

表1は、上記の各「遺伝子番号」に対応する情報を要約する。「ヌクレオチド配列番号X」として同定されるヌクレオチド配列は、表1において同定される「cDNAクローンID」から、およびいくつかの場合において、さらなる関連のDNAクローンから得られる、部分的に相同な（「重複する」）配列から構築された。重複する配列は、高い冗長性の単一の連続した配列に構築され（通常、各ヌクレオチド位置で3～5個の重複する配列）、配列番号Xとして同定される最終的な配列を得た。

【0088】

cDNAクローンIDは、その日付に寄託され、そして「ATCC受託番号Zおよび日付」において列挙される対応する受託番号が与えられた。寄託物のいくつかは、同じ遺伝子に対応する複数の異なるクローンを含む。「ベクター」は、cDNAクローンIDにおいて含まれるベクターの型をいう。

【0089】

「総ヌクレオチド配列」は、「遺伝子番号」によって同定されるコンティグにおけるヌクレオチドの総数をいう。寄託されたプラスミドは、これらの配列の全てを含み得、この配列は、配列番号Xの「クローン配列の5'ヌクレオチド」および「クローン配列の3'ヌクレオチド」として示されるヌクレオチドの位置に

よって反映される。推定メチオニン開始コドンの配列番号Xのヌクレオチドの位置は(存在する場合)、「開始コドンの5'ヌクレオチド」として同定される。同様に、推定シグナル配列の配列番号Xのヌクレオチドの位置は(存在する場合)、「シグナルペプチドの第一のアミノ酸の5'ヌクレオチド」として同定される。

【0090】

翻訳されたアミノ酸配列は、ポリヌクレオチド配列の第1翻訳コドンで始まり、「アミノ酸配列番号Y」として同定されるが、他のリーディングフレームもまた、公知の分子生物学技術を使用して容易に翻訳され得る。これらの代替的オープンリーディングフレームによって産生されるポリペプチドは、本発明によって具体的に意図される。

【0091】

配列番号X(ここで、Xは、配列表に開示されたポリヌクレオチド配列のいずれかであり得る)および翻訳される配列番号Y(ここで、Yは、配列表に開示されたポリペプチド配列のいずれかであり得る)は、十分に正確であり、そしてそうでなければ、当該分野において周知でありかつ以下でさらに記載される種々の使用に適切である。例えば、配列番号Xは、配列番号Xにおいて含まれる核酸配列または寄託されたプラスミドに含まれるcDNAを検出する核酸ハイブリダイゼーションプローブを設計することを含む使用を有するが、これらに限定されない。これらのプローブはまた、生物学的サンプル中の核酸分子にハイブリダイズし、それによって本発明の種々の法医学の方法、および診断の方法を可能にする。同様に、配列番号Yから同定されるポリペプチドは、表1において同定されたcDNAクローンによりコードされる分泌タンパク質に特異的に結合する抗体を産生することを含むが、これらに限定されない使用を有する。

【0092】

それにもかかわらず、配列決定反応によって生じるDNA配列は、配列決定のエラーを含み得る。エラーは、誤って同定されたヌクレオチドとして、または生じたDNA配列におけるヌクレオチドの挿入または欠失として存在する。誤って挿入されたか、または欠失されたヌクレオチドは、推定アミノ酸配列のリーディ

ングフレームにおいてフレームシフトを引き起こす。これらの場合において、生じたDNA配列は、実際のDNA配列と99.9%（例えば、1000塩基を超えるオープンリーディングフレームにおける1塩基の挿入または欠失）を超えて同一であり得るにもかかわらず、推定アミノ酸配列は、実際のアミノ酸配列とは異なる。

【0093】

従って、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列における正確さを必要とするこれらの適用のために、本発明は、配列番号Xとして同定された作製されたヌクレオチド配列、および配列番号Yとして同定された推定の翻訳されたアミノ酸配列のみではなく、表1において記載されるような、ATCCに寄託された本発明のヒトcDNAを含むプラスミドDNAのサンプルもまた提供する。各々の寄託されたプラスミドのヌクレオチド配列は、公知の方法に従って寄託されたプラスミドの配列決定により容易に決定され得る。

【0094】

次いで、推定アミノ酸配列は、このような寄託物から証明され得る。さらに、特定のプラスミドによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列はまた、ペプチド配列決定により、または寄託されたヒトcDNAを含む適切な宿主細胞中でタンパク質を発現し、このタンパク質を収集し、そしてその配列を決定することにより、直接的に決定され得る。

【0095】

また、cDNAプラスミドを含むベクターの名前を表1に提供する。各ベクターは、当該分野において、慣用的に使用される。以下のさらなる情報は、利便性のために提供される。

【0096】

ベクター Lambda Zap (米国特許第5,128,256号および同第5,286,636号)、Uni-Zap XR (米国特許第5,128,256号および同第5,286,636号)、Zap Express (米国特許第5,128,256号および同第5,286,636号)、pBluescript (pBS) (Short, J.M.ら、Nucleic Acids Re

s. 16:7583-7600 (1988); Alting-Mees, M. A. および Short, J. M., Nucleic Acids Res. 17:9494 (1989)) ならびに pBK (Alting-Mees, M. A. ら、Strategies 5:58-61 (1992)) は、Stratagene Cloning Systems, Inc., 11011 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA, 92037 から市販されている。pBS は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そして pBK はネオマイシン耐性遺伝子を含む。ファージミド pBS は、Zap ベクター および Uni-Zap XR ベクター から切り出され得、そして ファージミド pBK は、Zap 発現ベクター から切り出され得る。両方のファージミドは、E. coli 株 XL-1 Blue (これもまた、Stratagene から入手可能である) に形質転換され得る。

【0097】

ベクター pSport1、pCMVSport 1.0、pCMVSport 2.0 および pCMVSport 3.0 は、Life Technologies, Inc., P.O. Box 6009, Gaithersburg, MD 20897 から得られた。全ての Sport ベクター はアンピシリン耐性遺伝子を含み、そして E. coli 株 DH10B (これもまた、Life Technologies から入手可能である) に形質転換され得る。例えば、Gruber, C. E. ら、Focus 15:59 (1993) を参照のこと。ベクター-lafmid BA (Bento Soares, Columbia University, NY) は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そして E. coli 株 XL-1 Blue に形質転換され得る。ベクター pCR (登録商標) 2.1 (これは Invitrogen, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008 から入手可能である) は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そして E. coli 株 DH10B (Life Technologies から入手可能である) に形質転換され得る。例えば、Clark, J. M., Nuc. Acids Res. 16:9677-9686 (1988) および Mead, D. ら、Bio/Technology 9:(1991) を

参照のこと。

【0098】

本発明はまた、配列番号X、配列番号Y、および/または寄託されたプラスミド(cDNAプラスミド:Z)に対応する遺伝子に関する。対応する遺伝子は、本明細書中に開示される配列情報を使用して、公知の方法に従って単離され得る。このような方法は、開示された配列からプローブまたはプライマーを調製する工程、およびゲノム物質の適切な供給源から対応する遺伝子を同定または増幅する工程を包含するが、これらに限定されない。

【0099】

本発明においてまた提供されるものは、対立遺伝子改変体、オルトログ(ortholog)、および/または種相同体である。当該分野において公知である手順は、本明細書中で開示された配列またはATCCに寄託されたクローンからの情報を用いて、配列番号X、配列番号Y、および/またはcDNAプラスミド:Zに対応する遺伝子の全長遺伝子、対立遺伝子改変体、スプライス改変体、全長コード部分、オルトログ、および/または種相同体を得るために使用され得る。例えば、対立遺伝子改変体および/または種相同体は、本明細書中に提供される配列から適切なプローブまたはプライマーを作製し、そして対立遺伝子改変体および/または所望の相同体について適切な核酸供給源をスクリーニングすることにより単離および同定され得る。

【0100】

本発明は、配列番号Xの核酸配列および/またはcDNAプラスミド:Zを含むか、あるいはこれらからなるポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、配列番号Yのポリペプチド配列、配列番号Xによりコードされるポリペプチド、および/またはcDNAプラスミド:Z中のcDNAによりコードされるポリペプチドを含むか、あるいはこれらからなるポリペプチドを提供する。配列番号Yのポリペプチド配列、配列番号Xによりコードされるポリペプチド、および/またはcDNAプラスミド:Z中のcDNAによりコードされるポリペプチドを含むか、あるいはこれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明により包含される。本発明はさらに、配列番号Xの核酸配列の相補体、

および/またはcDNAプラスミド：Z中のcDNAのコード鎖の相補体を含むか、あるいはこれらからなるポリヌクレオチドを包含する。

【0101】

多くのポリヌクレオチド配列（例えば、EST配列）は、公に利用可能であり、そして配列データベースを通してアクセス可能であり、そして本発明の着想の前に公に利用可能であったかもしれない。好ましくは、このような関連するポリヌクレオチドは、本発明の範囲から特に除外される。全ての関連配列を列挙することは、本出願の開示では非常に煩わしい。従って、好ましくは、配列番号Xから、一般式a - bにより記載されるヌクレオチド配列（ここで、aは配列番号Xの1と配列番号Xの最終ヌクレオチド - 15との間の任意の整数であり、bは15 ~ 配列番号Xの最終ヌクレオチドの整数であり、ここでaおよびbの両方は配列番号Xに示されるヌクレオチド残基の位置に対応し、そしてここでbはa + 14以上である）を含む1つ以上のポリヌクレオチドが除外される。

【0102】

（全長遺伝子の回収のためのRACEプロトコル）

部分的cDNAクローンは、Frohman, M. Aら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85: 8998 - 9002 (1988)に記載されたcDNA末端の高速増幅(RACE)手順を利用することにより全長を作製し得る。5'末端または3'末端のいずれかが欠失しているcDNAクローンは、翻訳の開始コドンまたは終止コドンのそれぞれに伸長する欠失塩基対を含むように再構築され得る。いくつかの場合において、cDNAは、そのために翻訳の開始を欠失している。以下に、この本来の5' RACE手順の改変を簡単に記載する。ポリA+または全RNAを、Superscript II (Gibco/BRL)およびcDNA配列に特異的なアンチセンスプライマーまたは相補的プライマーを用いて逆転写する。そのプライマーを、Microcon Concentrator (Amicon)を用いて反応から除去する。次いで、第1鎖cDNAを、dATPおよび末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(Gibco/BRL)を用いて、添付する。このように、アンカー配列を産生し、これは、PCR増幅のために必要である。第2鎖をdA-テイル含有PCR

緩衝液、Taq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer Cetus)、5'末端で3つの隣接制限部位(XhoI、SalIおよびClaI)を含むオリゴdTプライマーならびにこれらの制限部位を正しく含むプライマーから合成する。この2本鎖cDNAを同じプライマーならびにネスティッドcDNA特異的アンチセンスプライマーを用いて40サイクルでPCR増幅する。このPCR産物を、エチジウムブロマイドアガロースゲル上でサイズ分離し、そして欠失しているタンパク質コードDNAの推定サイズのcDNA産物を含むゲルの領域を取り出す。cDNAをMagic PCR Prep kit(Promega)を用いてアガロースゲルから精製し、XhoIまたはSalIを用いて制限消化し、そしてプラスミド(例えば、pBluescript SKII(Stratagene))にXhoI部位およびEcoRV部位で連結する。このDNAを細菌に形質転換し、そしてこのプラスミドクローンを配列決定して、正確なタンパク質コード挿入物を同定する。正確な5'末端を、推定的に同定された相同体を有するこの配列と部分的cDNAクローンを有する重複を比較することにより確認する。当該分野において公知の同様の方法および/または市販のキットを使用して、増幅し、そして3'末端を回収する。

【0103】

いくつかの、品質制御キットが購入のために市販されている。上記のそれらと同様の試薬および方法は、全長遺伝子を回収をするための5' RACEおよび3' RACEの両方について、Gibco/BRLからキットの形態で供給される。第2のキットは、Clontechから入手可能である。このキットは、Dumasら、Nucleic Acids Res., 19:5227-32(1991)により開発された、関連技術の改変(SLIC(一本鎖cDNAへの、一本鎖の連結))である。手順における主な違いは、RNAを、逆転写後にアルカリ加水分解し、そしてRNAリガーゼを使用して、第1鎖cDNAに、制限部位を含むアンカープライマーを連結することである。これは、過去に配列決定をするのが困難なポリTの伸長を生じるdAテーリング反応における必要性を除去する。

【0104】

RNAからの5' cDNAまたは3' cDNAを産生する代替は、cDNAライブラリー二本鎖DNAを使用することである。非対称性PCR増幅アンチセンスcDNA鎖を、アンチセンスcDNA特異的プライマーおよびプラスミドアンカープライマーを用いて合成する。これらのプライマーを除去し、そして対称PCR反応を、ネストしたcDNA特異的アンチセンスプライマーおよびプラスミドアンカープライマーを用いて実施する。

【0105】

(5'末端配列または3'末端配列を産生し、全長遺伝子を得るための、RNAリガーゼのプロトコル)

一旦、目的の遺伝子が同定されると、本来のcDNAプラスミド中には存在しないかもしれない遺伝子の5'部分または3'部分の同定のためのいくつかの方法が利用可能になる。これらの方法は、以下を含むがこれらに限定されない：フィルタープローブ探索、特異的プローブを使用するクローン富化、5' RACEおよび3' RACEと類似および同一のプロトコル。全長遺伝子は、ライブラリー中に存在し得、そして探索によって同定され得るが、一方、5'末端または3'末端を生成するために有用な方法は、欠けている情報を生成するために、本来のcDNAからの既存の配列情報を、使用することである。5' RACEに類似する方法は、所望の全長遺伝子の欠けている5'末端を生成するために利用可能である(この方法は、Fromont-Racineら、Nucleic Acids Res., 21(7):1683-1684(1993)によって発表された)。簡潔には、特定のRNAオリゴヌクレオチドを、全長遺伝子RNA転写物をおそらく含むRNAの集団の5'末端に連結し、そして連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを含むプライマーセットを使用して、所望の全長遺伝子の5'部分をPCR増幅する。次いで、この増幅した産物を配列決定し得、そしてこれを使用して全長遺伝子を生成し得る。この方法は、所望の供給源から単離された総RNAを用いて開始し、この手順における必要条件ではないが、ポリA RNAを使用し得る。次いで、RNA調製物を、必要ならばホスファターゼで処理して、後のRNAリガーゼ工程を妨害し得る分解または損傷RNAの5'リン酸

基を排除し得る。次いで、使用された場合、ホスファターゼを不活化し、そしてRNAをメッセンジャーRNAの5'末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼを用いて処理する。この反応は、次いでT4 RNAリガーゼを用いてRNAオリゴヌクレオチドに連結され得る、キャップ切断RNAの5'末端に5'リン酸基を残す。次いで、この改変型RNA調製物を、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いる、第一鎖cDNA合成のためのテンプレートとして使用し得る。次いで、第一鎖合成反応物を、連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的のIgSF遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを用いる、所望の5'末端のPCR増幅のためのテンプレートとして使用し得る。次いで、得られた生成物を配列決定し、そして分析して5'末端配列が関連するIgSF遺伝子に属することを確認する。

【0106】

(ポリヌクレオチドフラグメントおよびポリペプチドフラグメント)

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチド(核酸)の、ポリヌクレオチドフラグメントに関する。本発明において、「ポリヌクレオチドフラグメント」とは、以下である核酸配列を有するポリヌクレオチドをいう：cDNAプラスミドZに含まれるcDNAの一部か、もしくはcDNAプラスミドZに含まれるcDNAによりコードされるポリペプチドをコードするcDNAの一部；配列番号Xもしくはその相補鎖におけるポリヌクレオチド配列の一部；配列番号Yのポリペプチドの一部をコードするポリヌクレオチド配列；あるいは配列番号Xによりコードされるポリペプチドの一部をコードするポリヌクレオチド配列。本発明のヌクレオチドフラグメントは、好ましくは、少なくとも約15nt、そしてより好ましくは少なくとも約20nt、さらにより好ましくは少なくとも約30nt、そしてなおより好ましくは少なくとも約40nt、少なくとも約50nt、少なくとも約75nt、少なくとも約100nt、少なくとも約125nt、または少なくとも約150ntの長さである。例えば、「少なくとも約20ntの長さ」のフラグメントは、cDNAプラスミドZのcDNA配列に含まれる配列または配列番号Xもしくはその相補鎖に示されるヌクレオチド配列由来の20以上の連続する塩基を含むことが意図される。この文脈において「約(おおよそ)」は、特

に記載された値、あるいはそれより数個（5、4、3、2、または1）のヌクレオチドだけ大きいかまたは小さな値を含む。これらのヌクレオチドフラグメントは、本明細書中で議論されるように、診断プローブおよびプライマーとしての使用を含むが、それらに限定されない使用を有する。もちろん、より大きなフラグメント（例えば、少なくとも150、175、200、250、500、600、1000または2000のヌクレオチドの長さ）もまた、本発明に含まれる。

【0107】

さらに、本発明のポリヌクレオチドフラグメントの代表例としては、例えば、配列番号X、またはその相補鎖の以下のおおよそのヌクレオチド数の配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる：1～50、51～100、101～150、151～200、201～250、251～300、301～350、351～400、401～450、451～500、501～550、551～600、651～700、701～750、751～800、800～850、851～900、901～950、951～1000、1001～1050、1051～1100、1101～1150、1151～1200、1201～1250、1251～1300、1301～1350、1351～1400、1401～1450、1451～1500、1501～1550、1551～1600、1601～1650、1651～1700、1701～1750、1751～1800、1801～1850、1851～1900、1901～1950、1951～2000、2001～2050、2051～2100、2101～2150、2151～2200、2201～2250、2251～2300、2301～2350、2351～2400、2401～2450、2451～2500、2501～2550、2551～2600、2601～2650、2651～2700、2701～2750、2751～2800、2801～2850、2851～2900、2901～2950、2951～3000、および/または3001-3040。この文脈において、「おおよそ（約）」は、特に記載された範囲、またはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（5、4、3、2、または1）のヌクレオチドだけ大きいか、または小さな範囲を含む。好ましくは、これらのフラグメントは、その配列が一部である

ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの、機能的活性（例えば、生物学的活性）を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのフラグメントは、本明細書中、上記で議論されるようにプローブまたはプライマーとして使用され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条件下でこれらのフラグメントの1つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれ、これらのポリヌクレオチドまたはフラグメントによりコードされるポリペプチドも同様に含まれる。

【0108】

さらに、本発明のポリヌクレオチドフラグメントの代表例としては、例えば、cDNAプラスミドZに含まれるcDNAヌクレオチド配列、またはその相補鎖の以下のおおよそのヌクレオチド数の配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる：1～50、51～100、101～150、151～200、201～250、251～300、301～350、351～400、401～450、451～500、501～550、551～600、651～700、701～750、751～800、800～850、851～900、901～950、951～1000、1001～1050、1051～1100、1101～1150、1151～1200、1201～1250、1251～1300、1301～1350、1351～1400、1401～1450、1451～1500、1501～1550、1551～1600、1601～1650、1651～1700、1701～1750、1751～1800、1801～1850、1851～1900、1901～1950、1951～2000、2001～2050、2051～2100、2101～2150、2151～2200、2201～2250、2251～2300、2301～2350、2351～2400、2401～2450、2451～2500、2501～2550、2551～2600、2601～2650、2651～2700、2701～2750、2751～2800、2801～2850、2851～2900、2901～2950、2951～3000、および/または3001-3040。この文脈において、「おおよそ(約)」は、特に記載された範囲、あるいはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個(5、4、3、2、

または1)のヌクレオチドだけ大きいか、または小さな範囲を含む。好ましくは、これらのフラグメントは、cDNAプラスミドZに含まれるcDNAヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの機能的活性(例えば、生物学的活性)を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのフラグメントは、本明細書中で議論されるように、プローブまたはプライマーとして使用され得る。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジエンシー条件下で1つ以上のこれらのフラグメントにハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれ、これらのポリヌクレオチドまたはフラグメントによりコードされるポリペプチドもまた、含まれる。

【0109】

本発明において、「ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号Yに含まれるアミノ酸配列の一部、配列番号Xのポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の一部、および/またはcDNAプラスミドZ中のcDNAによってコードされるアミノ酸配列の一部であるアミノ酸配列をいう。タンパク質(ポリペプチド)フラグメントは、「自立構造(free-standing)」であり得るか、あるいはより大きなポリペプチド(このフラグメントが、部分または領域(最も好ましくは単一の連続した領域として)を形成する)内に含まれ得る。本発明のポリペプチドフラグメントの代表例としては、例えば、配列番号Yのコード領域の、以下のおおよそのアミノ酸数のアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる: 1~20、21~40、41~60、61~80、81~100、102~120、121~140、141~160、161~180、181~200、201~220、221~240、241~260、261~280、281~300、301~320、321~340、341~360、361~380、381~400、401~420、421~440、441~460、461~480、481~500、501~520、521~540、541~560、561~580、581~600、および/または601-613。さらに、本発明のポリペプチドフラグメントは、少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、110、120、130

、140、または150のアミノ酸の長さであり得る。この文脈において、「約（おおよそ）」とは、特に記載された範囲または値、あるいはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個（5、4、3、2、または1）のアミノ酸だけ大きいかまたは小さな、範囲または値を含む。これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

【0110】

タンパク質のN末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、タンパク質の1つ以上の生物学的機能の損失の改変を生じるとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、リガンドに結合する能力）は、なお保持され得る。例えば、ポリペプチドの完全な形態または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび/または抗体に結合する、短縮型ムテインの能力は、完全なポリペプチド、または成熟ポリペプチドの大部分より少ない残基が、N末端から除去される場合には、一般的に保持される。完全なポリペプチドのN末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するかどうかは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の別の方法によって容易に決定され得る。多数の欠失したN末端アミノ酸残基を有するムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫原性活性を保持し得るようである。実際に、6つと同じくらい少ないアミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

【0111】

従って、本発明のポリペプチドフラグメントとしては、分泌タンパク質および成熟形態が挙げられる。さらに好ましいポリペプチドフラグメントとしては、アミノ末端もしくはカルボキシ末端またはその両方から、連続した一連の欠失した残基を有する分泌タンパク質、もしくは成熟形態が挙げられる。例えば、任意の数のアミノ酸（1～60の範囲）は、分泌ポリペプチドもしくは成熟形態のいずれかのアミノ末端から欠失され得る。同様に、任意の数のアミノ酸（1～30の範囲）が、分泌タンパク質もしくは成熟形態のカルボキシ末端から欠失され得る。さらに、上記のアミノ末端およびカルボキシ末端の欠失の任意の組み合わせは好ましい。同様に、これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレ

オチドもまた好ましい。

【0112】

本発明は、本明細書中で開示されるポリペプチド（例えば、配列番号Yのポリペプチド、配列番号Xに含まれるポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド、および/またはcDNAプラスミドZに含まれるcDNAによりコードされるポリペプチド）のアミノ酸配列のアミノ末端から、1つ以上の欠失した残基を有するポリペプチドを、さらに提供する。特に、N末端の欠失は、一般式 $m - q$ によって記載され得、ここで q は、本発明のポリペプチド（例えば、配列番号Yに開示されるポリペプチド）におけるアミノ酸残基の総数を表す全整数であり、そして m は、 $2 \sim q - 6$ の範囲の任意の整数として定義される。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび/または改変体を含む）もまた、本発明に含まれる。

【0113】

また、上記のように、タンパク質のC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、このタンパク質の1つ以上の生物学的機能の損失の改変を生じるとしても、他の機能的活性（例えば、生物学的活性、多量体化する能力、リガンドに結合する能力）は、なお保持され得る。例えば、ポリペプチドの完全な形態または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび/またはこの抗体に結合する、短縮型ムテインの能力は、完全なポリペプチド、または成熟ポリペプチドの大部分より少ない残基が、C末端から除去される場合には、一般的に保持される。完全なポリペプチドのC末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の他の方法によって容易に決定され得る。多数の欠失したC末端アミノ酸残基を有するムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫原性活性を保持し得るようである。実際に、6つと同じくらい少ないアミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

【0114】

従って、本発明は、本明細書中で開示されるポリペプチド（例えば、配列番号Yのポリペプチド、配列番号Xに含まれるポリヌクレオチド配列によりコードさ

れるポリペプチド、および/またはcDNAプラスミドZに含まれるcDNAによりコードされるポリペプチド)のアミノ酸配列のカルボキシ末端からの1つ以上の残基を有するポリペプチドを、さらに提供する。特に、C末端の欠失は、一般式1 - nによって記載され得、ここでnは、6 ~ q - 1の範囲の任意の全整数であり、そしてここでnは、本発明のポリペプチドにおけるアミノ酸残基の位置に対応する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(フラグメントおよび/または改変体を含む)もまた、本発明により含まれる。

【0115】

さらに、上記のN末端またはC末端の欠失のいずれかを組み合わせて、N末端およびC末端欠失型ポリペプチドを産生し得る。本発明はまた、アミノ末端およびカルボキシ末端の両方から1つ以上の欠失したアミノ酸を有するポリペプチドを提供する。このポリペプチドは、一般的に、配列番号X(例えば、好ましくは配列番号Yとして開示されるポリペプチドを含むが、これに限定されない)および/またはcDNAプラスミドZ中のcDNA、ならびに/あるいはそれらの相補鎖によってコードされるポリペプチドの、残基m - nを有する場合に記載され得、ここでnおよびmは、上記のような整数である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(フラグメントおよび/または改変体を含む)もまた、本発明に含まれる。

【0116】

配列番号Yのポリペプチドに含まれる任意のポリペプチド配列、配列番号Xとして記載されるポリヌクレオチド配列によってコードされる、任意のポリペプチド配列、またはcDNAプラスミドZ中のcDNAによってコードされる任意のポリペプチド配列は、そのポリペプチドの特定の好ましい領域を決定するために、分析され得る。例えば、配列番号XまたはcDNAプラスミドZ中のcDNAのポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、DNASTARコンピュータアルゴリズム(DNASTAR, Inc., 1228 S. Park St., Madison, WI 53715 USA; <http://www.dnastar.com/>)のデフォルトパラメーターを使用して、分析され得る。

【0117】

DNA STARコンピューターアルゴリズムを使用して慣用的に得られ得るポリペプチドの領域としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：Garnier - Robsonの -領域、 -領域、ターン領域、およびコイル領域、Chou - Fasmanの -領域、 -領域、およびターン領域、Kyte - Doolittleの親水性領域および疎水性領域、Eisenbergの -両親媒性領域および -両親媒性領域、Karplus - Schulzの可撓性領域、Eminiの表面形成領域ならびに高い抗原性指標のJameson - Wolfの領域。この点で、本発明の非常に好ましいポリヌクレオチドの中に、いくつかの構造的特徴（例えば、上記の特徴のいくつか（例えば、1、2、3または4））と組み合わせられる領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがある。

【0118】

さらに、Kyte - Doolittle親水性領域および疎水性領域、Emini表面形成領域、ならびに高い抗原性指標のJameson - Wolf領域（すなわち、Jameson - Wolfプログラムのデフォルトパラメータを使用して同定されるような、1.5より大きいか、または1.5に等しい抗原性指標を有する、4つ以上の連続するアミノ酸を含む）を慣用的に使用して、抗原性に対する高い程度の潜在性を表すポリペプチドの領域を決定し得る。高い抗原性の領域は、免疫応答の開始プロセスにおいて、抗原認識が生じ得る環境中のポリペプチドの表面上に曝されるようであるポリペプチドの領域を表す値を選択することによって、DNA STAR分析によるデータから決定される。

【0119】

本発明の好ましいポリペプチドフラグメントは、そのアミノ酸配列がフラグメントであるポリペプチド配列の、機能的活性（例えば、生物学的活性）を示すアミノ酸配列を含むか、またはあるいは、これらからなるフラグメントである。「機能的活性」を示すポリペプチドとは、全長タンパク質と関連した1つ以上の公知の機能的活性（例えば、前述のような、生物学的活性、抗原性、免疫原性、および/または多量体化など）を示し得るポリペプチドを意味する。

【0120】

他の好ましいポリペプチドフラグメントは、生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントとは、本発明のポリペプチドの活性に対して、同一である必要はないが、類似する活性を示すフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または低下した望ましくない活性を含み得る。

【0121】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号Yのポリペプチドの1、2、3、4、5以上の抗原性フラグメントか、またはその部分を含むか、またはあるいはそれらからなる。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび/または改変体を含む）もまた、本発明に含まれる。

【0122】

本発明は、以下のポリペプチドを含むか、またはあるいは以下からなるポリペプチドを含む：配列番号Yに示されるポリペプチド配列のエピトープ、またはcDNAプラスミドZ中のcDNAによりコードされるポリペプチド配列のエピトープ、あるいは前述で定義されるように、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件下で、配列番号Xのエピトープコード配列またはcDNAプラスミドZに含まれるエピトープコード配列の相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列のエピトープ。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号Xに開示される配列など）、本発明のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列の相補鎖のポリヌクレオチド配列、および前記で定義されるように、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件下で、この相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む。

【0123】

用語「エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、動物において、好ま

しくは哺乳動物において、そして最も好ましくはヒトにおいて抗原性活性または免疫原性活性を有するポリペプチドの部分を用いる。好ましい実施形態において、本発明は、エピトープを含むポリペプチド、およびこのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。「免疫原性エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、当該分野で公知の任意の方法によって決定されるような（例えば、下記に記載される抗体を産生するための方法による）、動物における抗体応答を誘発するタンパク質の一部として定義される（例えば、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002(1983)を参照のこと）。用語「抗原性エピトープ」とは、本明細書中で使用される場合、当該分野で周知の任意の方法（例えば、本明細書中に記載される免疫アッセイによる）によって決定されるような、抗体がその抗原に免疫特異的に結合し得るタンパク質の一部として定義される。免疫特異的結合は、非特異的結合は除外するが、他の抗原との交差反応を除外する必要はない。抗原性エピトープは、免疫原性である必要はない。

【0124】

エピトープとして機能するフラグメントは、任意の従来の方法によって産生され得る。（例えば、Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135(1985)を参照のこと。これはさらに、米国特許第4,631,211号に記載される）。

【0125】

本発明においては、抗原性エピトープは、好ましくは、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7アミノ酸配列を含み、より好ましくは、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50アミノ酸配列を含み、そして最も好ましくは約15アミノ酸と約30アミノ酸との間の配列を含む。免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含有する好ましいポリペプチドは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100アミノ酸残基

の長さである。さらなる非排他的に好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープおよびその一部を含む。抗原性エピトープは、有用である（例えば、エピトープに特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体を含む）を惹起するため）。好ましい抗原性エピトープは、本明細書中で開示される抗原性エピトープ、および2、3、4、5以上のこれらの抗原性エピトープの任意の組合わせを含む。抗原性エピトープは、イムノアッセイにおいて、標的分子として使用され得る。（例えば、Wilsonら、Cell 37:767-778(1984); Sutcliffeら、Science 219:660-666(1983)を参照のこと）。

【0126】

同様に、免疫原性エピトープを使用して、例えば、当該分野で周知の方法に従う抗体を誘導し得る。（例えば、Sutcliffeら、前出; Wilsonら、前出; Chowら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914; および Bittleら、J. Gen. Virol. 66:2347-2354(1985)を参照のこと）。好ましい免疫原性エピトープは、本明細書で開示される免疫原性および2、3、4、5以上のこれらの免疫原性エピトープの任意の組合せを含む。1つ以上の免疫原性エピトープを含むポリペプチドは、キャリアタンパク質（例えば、アルブミン）とともに動物系（例えば、ウサギまたはマウス）に対する抗体応答を誘発するために提示され得るか、またはこのポリペプチドが十分に長い場合（少なくとも約25アミノ酸）、そのポリペプチドはキャリアなしで提示され得る。しかし、8~10個程度の少なさのアミノ酸を含む免疫原性エピトープは、少なくとも変性ポリペプチド中の直鎖状エピトープに結合し得る抗体を惹起するには十分であることが示されている（例えば、ウェスタンブロットティングにおいて）。

【0127】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導するために使用され得る。これらの周知の方法としては、インビボ免疫、インビトロ免疫、およびファージディスプレイ法が挙げられるが、それらに限定されない。例えば、Sutcliffeら、前出; Wilsonら、前出、およ

びBittleら、J. Gen. Virol., 66:2347-2354 (1985)を参照のこと。インビボ免疫を使用する場合、動物を遊離ペプチドを用いて免疫し得る；しかし、抗ペプチド抗体力価は、高分子キャリア（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）または破傷風トキソイド）にペプチドを結合させることによりブーストされ得る。例えば、システイン残基を含むペプチドは、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）のようなリンカーを用いてキャリアに結合され得る。その一方、他のペプチドは、より一般的な結合剤（例えば、グルタルアルデヒド）を用いてキャリアに結合され得る。ウサギ、ラット、およびマウスのような動物は、遊離のペプチドまたはキャリア結合ペプチドのいずれかを用いて、例えば、約100 μ gのペプチドまたはキャリアタンパク質およびフロイントアジュバントまたは免疫応答を刺激することが公知である他のアジュバントを含むエマルジョンを腹腔内注射および/または皮内注射することにより免疫される。いくつかのブースター注射が、抗ペプチド抗体の有用な力価を提供するために、例えば、約2週間の間隔で、必要とされ得る。この力価は、例えば、固体表面に吸着した遊離のペプチドを用いるELISAアッセイにより検出され得る。免疫した動物由来の血清中の抗ペプチド抗体の力価は、抗ペプチド抗体の選択（例えば、当該分野で周知の方法に従う固体支持体上のペプチドへの吸着および選択された抗体の溶出による）により上昇し得る。

【0128】

当業者に理解されるように、そして上記で考察されるように、本発明のポリペプチドおよびその免疫原性エピトープフラグメントおよび/または抗原性エピトープフラグメントは、他のポリペプチド配列に融合され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン（IgA、IgE、IgG、IgM）の定常ドメインまたはそれらの部分（CH1、CH2、CH3、またはそれらの任意の組み合わせ、およびこれらの部分）と融合し得、これがキメラポリペプチドを生じる。このような融合タンパク質は、精製を容易にし得、そしてインビボにおける半減期を増加し得る。このことは、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメ

インからなるキメラタンパク質について示された。例えば、EP 394,827; Trauneckerら、Nature, 331:84-86(1988)を参照のこと。上皮の関門を横切った免疫系への抗原の増強された送達は、FcRn結合パートナー(例えば、IgGフラグメントまたはFcフラグメント(例えば、PCT公開WO96/22024およびWO99/04813を参照のこと)に結合体化した抗原(例えば、インスリン)について実証されている。ジスルフィド架橋二量体構造を有するIgG融合タンパク質はまた、そのIgG部分ジスルフィド結合に起因して、単量体ポリペプチドまたはそれらのフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和において効果的であることが見出された。例えば、Fountoulakisら、J. Biochem., 270:3958-3964(1995)を参照のこと。

【0129】

同様に、EP-A-O 464 533(カナダ国対応出願2045869)は、別のヒトタンパク質またはその一部とともに免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を含む、融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質中のFc部分は、治療および診断において有利であり、従って、例えば改善された薬物動態学的特性を生じ得る(EP-A 0232 262)。あるいは、融合タンパク質が発現、検出、および精製された後に、Fc部分が欠失され得ることが望ましい。例えば、融合タンパク質が、免疫の抗原として使用される場合、そのFc部分は、治療および診断を妨げ得る。薬物探索において、例えばhIL-5のようなヒトタンパク質が、hIL-5のアンタゴニストを同定するための高処理能力スクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されている。(D. Bennettら、J. Molecular Recognition 8:52-58(1995); K. Johansonら、J. Biol. Chem. 270:9459-9471(1995)を参照のこと。)

さらに、本発明のポリペプチドは、融合されたポリペプチドの精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列と融合され得る。好ましい実施形態において、このマーカーアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 9

1311)において提供されるタグのようなヘキサ-ヒスチジンペプチドであり、それらの多くは市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製に有用な他のペプチドタグである「HA」タグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する(Wilsonら、Cell 37:767(1984))。

【0130】

従って、これら上記の任意の融合物は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを用いて操作され得る。

【0131】

上記のエピトープをコードする核酸はまた、エピトープタグ(例えば、血球凝集素(「HA」)タグまたはフラッグタグ(flag tag))として目的の遺伝子と組換えられ、発現されたポリペプチドの検出および精製を補助し得る。例えば、Janknechtらによって記載された系は、ヒト細胞株において発現される非変性融合タンパク質の迅速な精製を可能にする(Janknechtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897(1991))。この系において、目的の遺伝子は、遺伝子の読み取り枠が、6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグと翻訳で融合されるように、ワクシニア組換えプラスミド中にサブクローンされる。このタグは、融合タンパク質についての基質結合ドメインとしてはたらく。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞由来の抽出物は、Ni²⁺ニトリロ三酢酸アガロースカラムに充填され、そしてヒスチジンタグ化したタンパク質が、イミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出され得る。

【0132】

本発明のさらなる融合タンパク質は、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および/またはコドンシャッフリング(総称して「DNAシャッフリング」といわれる)の技術を通じて生成され得る。DNAシャッフリングを使用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、この

ような方法を用いて、変化した活性を有するポリペプチド、ならびにそのポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを生成し得る。一般には、米国特許第5,605,793号;同第5,811,238号;同第5,830,721号;同第5,834,252号;および同第5,837,458号、ならびにPattemら、Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33(1997);Harayama、Trends Biotechnol. 16(2):76-82(1998);Hanssonら、J. Mol. Biol. 287:265-76(1999);ならびにLorenzoおよびBlasco、Biotechniques 24(2):308-13(1998)(これらの特許および刊行物の各々は、本明細書によってその全体が参考として援用される)を参照のこと。1つの実施形態において、配列番号Xに対応するポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの改変は、DNAシャッフリングにより達成され得る。DNAシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的組換えにより、2つ以上のDNAセグメントをアセンブリして、ポリヌクレオチド配列における変化を産生することを含む。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドまたはコードされるポリペプチドは、組換え前に、エラープローンPCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法による、ランダムな変異誘発に供されることによって改変され得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの1つ以上の成分、モチーフ、セクション(section)、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどと組み換えられ得る。

【0133】

(ポリヌクレオチド改変体およびポリペプチド改変体)

本発明はまた、IgSF改変体を含む。本発明は、配列番号Xに開示されるポリヌクレオチド配列の改変体またはそれらに対する相補鎖の改変体、および/またはcDNAプラスミドZ中に含まれるcDNA配列の改変体に関する。

【0134】

本発明はまた、配列番号Yに開示されるポリペプチド配列の改変体、配列番号

Xのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド配列の改変体および/
またはcDNAプラスミドZ中のcDNAによってコードされるポリペプチド配
列の改変体を含む。

【0135】

「改変体」とは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが
それらの特性は保持している、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。一
般的に、改変体は全体的に非常に類似しており、そして、多くの領域において、
本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと同一である。

【0136】

従って、本発明の1つの局面は、以下からなる群より選択されるヌクレオチド
配列を有するポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子か、あるいはその代わ
りに以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド
からなる単離された核酸分子を提供する：(a)配列表に示さるようなアミノ酸
配列を有するIgSFポリペプチドをコードし、そして配列番号XまたはcDNA
プラスミドZのcDNAに記載されるようなヌクレオチド配列；(b)配列表
に示されそして配列番号XまたはcDNAプラスミドZのcDNAに記載される
ようなアミノ酸配列を有する成熟IgSFポリペプチドをコードするヌクレオチ
ド配列；(c)配列表に示されそして配列番号XまたはcDNAプラスミドZの
cDNAに記載されるようなアミノ酸配列を有するIgSFポリペプチドの生物
学的に活性なフラグメントをコードするヌクレオチド配列；(d)配列表に示さ
れそして配列番号XまたはcDNAプラスミドZのcDNAに記載されるアミノ
酸配列を有するIgSFポリペプチドの抗原性フラグメントをコードするヌクレ
オチド配列；(e)配列番号XまたはcDNAプラスミドZのcDNA中に含ま
れるヒトcDNAプラスミドによってコードされる完全アミノ酸配列を含むIg
SFポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(f)配列番号XまたはcD
NAプラスミドZのcDNA中に含まれるヒトcDNAプラスミドによってコー
ドされるアミノ酸配列を有する成熟IgSFポリペプチドをコードするヌクレオ
チド配列；(g)配列番号XまたはcDNAプラスミドZのcDNA中に含まれ
るヒトcDNAプラスミドによってコードされるアミノ酸配列を有するIgSF

ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントをコードするヌクレオチド配列；
(h) 配列番号XまたはcDNAプラスミドZのcDNA中に含まれるヒトcDNAプラスミドによってコードされるアミノ酸配列を有するIgSFポリペプチドの抗原性フラグメントをコードするヌクレオチド配列；(i) 上記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)または(h)における任意のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列。

【0137】

本発明はまた、例えば上記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)または(i)中の任意のヌクレオチド配列に少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるヌクレオチド配列を含むか、あるいはこれらからなる、核酸分子に関する。これらの核酸分子によってコードされるポリペプチドもまた、本発明によって含まれる。別の実施形態において、本発明は、上記の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)または(i)中のポリヌクレオチドに、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下または低いストリンジエンス条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むか、またはこれらからなる、核酸分子を含む。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下または低いストリンジエンス条件下でこれらの核酸分子の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた、これらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと同様に、本発明によって含まれ得る。

【0138】

本発明の別の局面は、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含むかまたはそれからなる、単離された核酸分子を提供する：(a) 配列表に示されかつ表1に記載されるアミノ酸配列を有するIgSFポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列；(b) 配列表に示されかつ表1に記載されるアミノ酸配列を有する成熟IgSFポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列；(c) 配列表に示されかつ表1に記載されるアミノ酸配列を有するIgSFポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントをコードする、ヌクレオチド配列；(d) 配列表に示されかつ表1に記載されるアミノ酸配列を有す

る I g S F ポリペプチドの抗原性フラグメントをコードする、ヌクレオチド配列 ; (e) A T C C 寄託物中に含まれる c D N A プラスミド中のヒト c D N A によりコードされかつ表 1 に記載される完全アミノ酸配列を含む I g S F ポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列 ; (f) A T C C 寄託物に含まれる c D N A プラスミド中のヒト c D N A によりコードされかつ表 1 に記載されるアミノ酸配列を有する成熟 I g S F ポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列 ; (g) A T C C 寄託物に含まれる c D N A プラスミド中のヒト c D N A によりコードされかつ表 1 に記載されるアミノ酸配列を有する I g S F ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントをコードする、ヌクレオチド配列 ; (h) A T C C 寄託物に含まれる c D N A プラスミド中のヒト c D N A によりコードされかつ表 1 に記載されるアミノ酸配列を有する I g S F ポリペプチドの抗原性フラグメントをコードする、ヌクレオチド配列 ; (i) 上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g) または (h) におけるヌクレオチド配列のいずれかに相補的な、ヌクレオチド配列。

【 0 1 3 9 】

本発明はまた、例えば、上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h) または (i) におけるヌクレオチド配列のいずれかに少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる、核酸分子に関する。これらの核酸分子によりコードされるポリペプチドもまた、本発明により包含される。別の実施形態において、本発明は、上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h) または (i) におけるポリヌクレオチドに、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジエンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むかまたはそれからなる、核酸分子を包含する。これらの核酸分子の相補体に、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジエンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた、本発明により包含され、同様に、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドも、本発明により包含される。

【0140】

本発明はまた、例えば、配列番号Yに示されるポリペプチド配列、配列番号Xにおけるヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド配列、cDNAプラスミドZ中のcDNAによりコードされるポリペプチド配列、および/またはこれらのポリペプチドのいずれかのポリペプチドフラグメント（例えば、本明細書中に記載されるフラグメント）に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含むかあるいはそれらからなる、ポリペプチドに関する。これらのポリペプチドをコードする核酸分子の相補体に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた、本発明により包含され、同様に、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドも本発明により包含される。

【0141】

本発明の参照ヌクレオチド配列に、例えば、少なくとも95%「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸によって、その核酸のヌクレオチド配列が、そのヌクレオチド配列がポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり5つまでの点変異を含み得ることを除いて、参照配列に対して同一であることを意図する。換言すれば、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有する核酸を得るために、参照配列のヌクレオチドの5%までが、欠失され得るか、または別のヌクレオチドで置換され得るか、あるいは参照配列中の総ヌクレオチドの5%までの数のヌクレオチドが参照配列中に挿入され得る。問い合わせ(query)配列は、表1に示される配列全体、ORF(オープンリーディングフレーム)、または本明細書中で記載されるように特定される任意のフラグメントであり得る。

【0142】

実際問題として、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータープログ

ラムを使用して従来的に決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間の最も良好な全体的な適合性（全体的な配列整列とも呼ばれる）を決定するための好ましい方法は、Brutlagら（Comp. App. Bio sci. 6: 237-245 (1990)）のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともにDNA配列である。RNA配列は、UからTに変換することによって比較され得る。この全体的な配列整列の結果は、同一性パーセント（%）で示される。同一性パーセントを算定するためにDNA配列のFASTDB整列において使用される好ましいパラメーターは：Matrix=Unitary、k-tuple=4、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=30、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty 0.05、Window Size=500または対象ヌクレオチド配列の長さ（どちらかより短い方）である。

【0143】

対象配列が、5'または3'欠失のために（内部欠失のためではなく）問い合わせ配列より短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、同一性パーセントを計算する場合に、FASTDBプログラムが対象配列の5'および3'の短縮を考慮しないからである。5'末端または3'末端で短縮されている対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして一致/整列されない対象配列の5'および3'である問い合わせ配列の塩基の数を計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致/整列されるか否かは、FASTDB配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、特定のパラメーターを用いて上記のFASTDBプログラムによって算定された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この補正されたスコアが、本発明の目的に使用されるものである。FASTDB整列によって示されるように、問い合わせ配列と一致/整列されない、対象配列の5'および3'の塩基の

外側の塩基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的で算定される。

【0144】

例えば、90塩基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために100塩基の問い合わせ配列に整列される。欠失が、対象配列の5'末端で生じ、従って、FASTDB整列は、5'末端の最初の10塩基で一致/整列を示さない。10個の不对合塩基は、配列の10%（一致していない5'および3'の末端の塩基の数/問い合わせ配列の塩基の総数）を表し、そのため10%が、FASTDBプログラムによって算定される同一性パーセントのスコアから差し引かれる。残りの90塩基が完全に一致する場合は、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例では、90塩基の対象配列が、100塩基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、その結果、対象配列の5'または3'に問い合わせと一致/整列しない塩基が存在しない。この場合、FASTDBによって算定される同一性パーセントは手動で補正されない。再び、問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列の5'または3'の塩基のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

【0145】

本発明の問い合わせアミノ酸配列に、例えば、少なくとも95%「同一」であるアミノ酸配列を有するポリペプチドにより、対象ポリペプチドのアミノ酸配列は、その対象ポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列の各100個のアミノ酸あたり5つまでのアミノ酸の変更を含み得ることを除いて、問い合わせ配列に同一であることが意図される。換言すれば、問い合わせアミノ酸配列に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列におけるアミノ酸残基の5%までが、挿入、欠失、（インデル（*indels*））または別のアミノ酸で置換され得る。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端位置で生じ得るか、またはそれらの末端位置の間のどこにでも生じ得、参照配列中の残基間で個々にかまたは参照配列内の1個以上連続する群の状態かのいずれかで、散在する。

【0146】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、表1に示されるアミノ酸配列またはそのフラグメント、配列番号Xにおけるヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメント、あるいはcDNAプラスミドZにおけるcDNAによりコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメントに対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラムを使用して従来のように決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間での最良の全体的な一致（全体的配列整列とも呼ばれる）を決定するための好ましい方法は、Brutlagら（Comp. App. Biosci. 6: 237-245 (1990)）のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータープログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列であるかまたは両方ともアミノ酸配列であるかのいずれかである。上記の全体的配列整列の結果は、同一性パーセントで示される。FASTDBアミノ酸整列に用いられる好ましいパラメーターは：Matrix=PAM 0、k-tuple=2、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=20、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Window Size=配列の長さ、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty=0.05、Window Size=500または対象アミノ酸配列の長さ（どちらかより短い方）である。

【0147】

対象配列が、N末端またはC末端欠失により（内部の欠失のためではなく）問い合わせ配列よりも短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、FASTDBプログラムが、全体的な同一性パーセントを算定する場合に、対象配列のN末端短縮およびC末端短縮を考慮しないからである。N末端およびC末端で短縮されている対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして、対応する対象残基と一致/整列しない、対象配列のN末端およびC末端である問い合わせ配列の残基の数を計算することによって補正される。残基が一致/整列されている

か否かは、FASTDB配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、上記のFASTDBプログラムによって特定のパラメーターを使用して計算された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この最終的な同一性パーセントのスコアが、本発明の目的で使用されるものである。問い合わせ配列と一致/整列していない対象配列のN末端側およびC末端側の残基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的のために考慮される。すなわち、対象配列の最も遠いN末端およびC末端残基の外側の問い合わせ残基位置のみである。

【0148】

例えば、90アミノ酸残基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために100残基の問い合わせ配列と整列される。欠失が対象配列のN末端で生じ、そしてそれゆえFASTDB整列は、N末端での最初の10残基の一致/整列を示さない。この10個の不对合残基は、配列の10%（一致していないN末端およびC末端の残基の数/問い合わせ配列中の残基の総数）を表し、その結果FASTDBプログラムによって計算される同一性パーセントのスコアから10%が差し引かれる。残りの90残基が完全に一致した場合、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例において、90残基の対象配列が、100残基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、そのため問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列のN末端またはC末端の残基は存在しない。この場合、FASTDBによって算定される同一性パーセントは、手動で補正されない。再び、FASTDB整列において示される、問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列のN末端およびC末端の外側の残基位置のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

【0149】

改変体は、コード領域、非コード領域、またはその両方における変化を含み得る。特に好ましいものは、サイレントな置換、付加、または欠失を生成するがコードされるポリペプチドの特性または活性を変化させない変化を含む、ポリヌクレオチド改変体である。遺伝コードの縮重に起因するサイレントな置換によって生成されるヌクレオチド改変体が、好ましい。さらに、50アミノ酸未満、40

アミノ酸未満、30アミノ酸未満、20アミノ酸未満、10アミノ酸未満、あるいは5~50アミノ酸、5~25アミノ酸、5~10アミノ酸、1~5アミノ酸、または1~2アミノ酸が、任意の組合せで置換、欠失、または付加されている改変体もまた、好ましい。ポリヌクレオチド改変体は、種々の理由(例えば、特定の宿主についてのコドン発現を至適化する(ヒトmRNAにおけるコドンを、E. coliのような細菌宿主によって好ましいコドンに変化させる))のために、生成され得る。

【0150】

天然に存在する改変体は、「対立遺伝子改変体」と呼ばれ、そして生物の染色体上の所定の遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの代替の形態のうちの1つをいう。(Genes II, Lewin, B., 編 John Wiley & Sons, New York (1985))。これらの対立遺伝子改変体は、ポリヌクレオチドレベルおよび/またはポリペプチドレベルのいずれかで変化し得、そして本発明に含まれる。あるいは、天然に存在しない改変体は、変異誘発技術によってまたは直接的な合成によって生成され得る。

【0151】

タンパク質工学および組換えDNA技術の公知の方法を使用して、改変体は、本発明のポリペプチドの特性を改善または変化させるために作製され得る。例えば、本明細書中に考察されるように、1つ以上のアミノ酸が、生物学的機能の実質的な欠損を伴わずに、本発明のポリペプチドのN末端またはC末端から欠失され得る。Ronら、J. Biol. Chem. 268:2984-2988(1993)の著者らは、3個、8個、または27個のアミノ末端アミノ酸残基を欠失させた後でさえもヘパリン結合活性を有する改変体KGFタンパク質を報告した。同様に、インターフェロンは、このタンパク質のカルボキシ末端から8~10個のアミノ酸残基を欠失させた後、10倍までのより高い活性を示した(Dobeliら、J. Biotechnology 7:199-216(1988))。

【0152】

さらに、豊富な証拠は、改変体が、天然に存在するタンパク質の生物学的活性

に類似する活性をしばしば保持することを実証する。例えば、Gayleおよび共同研究者ら(J. Biol. Chem. 268:22105-22111(1993))は、ヒトサイトカインIL-1aの広範囲にわたる変異分析を行った。彼らは、ランダムな変異誘発を使用して、分子の全長にわたって改変体当たり平均2.5アミノ酸の変化になる、3,500個を超える個々のIL-1a改変体を作製した。複数の変異が、全ての潜在的なアミノ酸の位置で試験された。この研究者らは、「分子の大部分は、[結合活性または生物学的活性]のいずれに対してもほとんど影響を伴わないで変化され得る」ことを見出した。(要約を参照のこと)。実際、試験された3,500個を超えるヌクレオチド配列のうち、わずか23個の独特なアミノ酸配列が、野生型と活性が有意に異なるタンパク質を生成した。

【0153】

さらに、ポリペプチドのN末端またはC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、1つ以上の生物学的機能の改変または欠失を生じたとしても、他の生物学的活性はなお保持され得る。例えば、分泌される形態を認識する抗体を誘導および/または結合する、欠失改変体の能力は、分泌される形態の大多数より少ない残基が、N末端またはC末端から除去される場合に保持されるようである。タンパク質のN末端またはC末端残基を欠損する特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の慣用的な方法によって容易に決定され得る。

【0154】

従って、本発明はさらに、本発明のポリペプチド(それらが改変体である)の機能的な活性(例えば、生物学的活性)を示すポリペプチド改変体を含む。このような改変体としては、活性に対する影響をほとんど有さないように、当該分野において公知の一般的な法則に従って選択される、欠失、挿入、逆位、反復、および置換が挙げられる。

【0155】

本出願は、本明細書中に開示される核酸配列に対して少なくとも80%、85

%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一の核酸分子に関し（例えば、NおよびC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする）、それらが機能的活性を有するポリペプチドをコードするかどうかに関わらない。これは、特定の核酸分子が機能的活性を有するポリペプチドをコードしないためであり、当業者は、例えば、ハイブリダイゼーションプローブまたはポリメラーゼ鎖反応（PCR）プライマーとして核酸分子をどのようにして使用するかを知る。機能的活性を有するポリペプチドをコードしない本発明の核酸分子の使用は、特に、（1）cDNAライブラリー内で遺伝子または対立遺伝子またはそれらのスプライス変異体を単離する工程；（2）Vermaら、*Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*、Pergamon Press、New York（1988）に記載されるような、遺伝子の正確な染色体位置を提供するための、中期染色体拡散へのインサイチュハイブリダイゼーション（例えば、「FISH」）；および（3）特定の組織内でmRNA発現を検出するためのNorthern Blot分析。

【0156】

しかし、本明細書中に開示される核酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一の配列を有する核酸分子が好ましく、これは、実際に本発明のポリペプチドの機能的活性を有するポリペプチドをコードする。

【0157】

当然のことながら、遺伝子コードの縮重に起因して、例えば、cDNAプラスミドZの核酸配列、表1（配列番号X）に示される核酸配列またはそのフラグメントに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の配列を有する多数の核酸分子が、「機能活性を有する」ポリペプチドをコードするということを、当業者は、直ちに理解する。実際に、これらのヌクレオチド配列のいずれかの縮重改変体すべてが、同じポリペプチドをコードするので、多くの場合、このことは、上記の比較アッセイを実行しなくても、当業者に明らかである。縮重改変体でないような核酸分子に

ついて、合理的な数がまた、機能活性を有するポリペプチドをコードすることが、当該分野でさらに理解される。なぜならば、当業者が、さらに以下に記載されるように、タンパク質を有意に機能させるかまたは機能しそうにないアミノ酸置換（例えば、1つの脂肪族アミノ酸を第2の脂肪族アミノ酸と置換すること）を完全に知っているからである。

【0158】

例えば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換の作製方法に関する手引きは、Bowie, J. U.ら、「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions」, Science 247: 1306 - 1310 (1990)に提供され、ここにおいてこの著者らは、タンパク質がアミノ酸配列の変化に対する寛容性を研究するための2つの主な戦略を示す。

【0159】

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

【0160】

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

【0161】

著者らが述べるように、これらの2つの戦略は、タンパク質がアミノ酸置換に驚くほど寛容であることを明らかにした。著者らはさらに、どのアミノ酸変化が、タンパク質中の特定のアミノ酸位置で許容されるようであることを示す。例えば、最も埋もれている(タンパク質の三次構造内の)アミノ酸残基は、非極性側鎖を必要とするが、表面側鎖の特徴は、一般にほとんど保存されない。さらに、寛容される保存的なアミノ酸置換は、脂肪族または疎水性アミノ酸のAla、Val、Leu、およびIleの置換；ヒドロキシル残基のSerおよびThrの置換；酸性残基のAspおよびGluの置換；アミド残基のAsnおよびGlnの置換、塩基性残基のLys、Arg、およびHisの置換；芳香族残基のPhe、Tyr、およびTrpの置換、ならびに小さなサイズのアミノ酸のAla、Ser、Thr、Met、およびGlyの置換を含む。保存的なアミノ酸置換以外に、本発明の改変体は、(i)1つ以上の非保存的なアミノ酸残基での置換、ここでは置換されるアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるアミノ酸残基であってもよく、もしくはそうでなくてもよい、または(ii)置換基を有する1つ以上のアミノ酸残基での置換、または(iii)別の化合物(例えば、ポリペプチドの安定性および/もしくは可溶性を増加するための化合物(例えば、ポリエチレングリコール))との成熟ポリペプチドの融合、または(iv)さらなるアミノ酸(例えば、IgG Fc融合領域ペプチド、またはリーダーもしくは分泌配列、または精製を容易にする配列)とのポリペプチドの融合を含む。このような改変体ポリペプチドは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内であることが考えられる。

【0162】

例えば、他の荷電されたアミノ酸または中性のアミノ酸での、荷電されたアミノ酸のアミノ酸置換を含むポリペプチド改変体は、改善された特徴(例えば、より少ない凝集性)を有するタンパク質を生成し得る。薬学的処方物の凝集は、凝集体の免疫原活性に起因して、活性を減少し、かつクリアランスを増加する。(Pinckardら、Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbinsら、Diabetes 36:838-845 (

1987); Clelandら、Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377(1993))。

【0163】

本発明のさらなる実施形態は、少なくとも1つのアミノ酸置換を含むが、50アミノ酸置換を超えず、さらにより好ましくは、40アミノ酸置換を超えず、なおより好ましくは、30アミノ酸置換を超えず、そしてなおさらにより好ましくは、20アミノ酸置換を超えないアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。もちろん、ポリペプチドは、好ましさの増大する順番に、配列番号Yのポリペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列、配列番号Xによりコードされるアミノ酸配列、および/または少なくとも1つのアミノ酸置換を含むが、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸置換を超えないアミノ酸置換を含むcDNAプラスミドZ中のcDNAによりコードされるアミノ酸配列を有することが非常に好ましい。特定の実施形態において、配列番号Yのアミノ酸配列またはそのフラグメント(例えば、本明細書に記載の成熟形態および/または他のフラグメント)、配列番号Xによりコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメント、ならびに/あるいはcDNAプラスミドXZによりコードされるアミノ酸配列またはそのフラグメントにおける付加、置換、および/または欠失の数は、1~5、5~10、5~25、5~50、10~50、または50~150であり、保存的アミノ酸置換が好ましい。本明細書中で議論されるように、本発明の任意のポリペプチドは、融合タンパク質を生成するために使用され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、第2のタンパク質と融合される場合、抗原性タグとして使用され得る。本発明のポリペプチドに対して惹起される抗体は、ポリペプチドに結合することによって、第2のタンパク質を間接的に検出するために使用され得る。さらに、分泌されるタンパク質は、細胞位置を輸送シグナルに基づいて標的化するので、分泌されることが示されている本発明のポリペプチドは、他のタンパク質に一旦融合されると標的化分子として使用され得る。

【0164】

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

【0165】

特定の好ましい実施形態において、本発明のタンパク質は、ポリペプチドがN末端欠失変異体および/またはC末端欠失変異体である融合ポリペプチドを含む。好ましい実施形態において、本出願は、特定のN末端欠失変異体およびC末端欠失変異体のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一の核酸分子に関する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（フラグメントおよび/または改変体を含む）はまた、本発明により宇含まれる。

【0166】

さらに、融合タンパク質はまた、本発明のポリペプチドの特徴を改良するために操作され得る。例えば、さらなるアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域が、宿主細胞からの精製または続く取り扱いおよび貯蔵の間の安定性ならびに持続性を改良するためにポリペプチドのN末端に付加され得る。また、ペプチド部分は、精製を容易にするためにポリペプチドに付加され得る。このような領域は、ポリペプチドの最終調製の前に除去され得る。ポリペプチドの取り扱いを容易にするためのペプチド部分の付加は、当該分野でよく知られ、そして慣用技術である。

【0167】

当業者に理解されるように、本発明のポリペプチドおよび上記のエピトープ保有フラグメントは、異種ポリペプチド配列と組合わされ得る。例えば、本発明のポリペプチドは、異種ポリペプチド配列に融合され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン（IgA、IgE、IgG、IgM）の定常ドメインまたはそれらの部分（ドメイン全体もしくはその部分の両方を含む、CH1、CH2、CH3、およびそれらの任意の組み合わせ）と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。これらの融合タンパク質は、精製を容易にし、そしてインビボでの半減期の増大を示す。1つの報告された例は、ヒトCD4 - ポリペプチド

の最初の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載する(EP 394, 827; Trauneckerら、Nature, 331: 84~86(1988))。(IgGに起因する)ジスルフィド結合二量体構造を有する融合タンパク質はまた、単量体ポリペプチドまたはそれらのタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和においてより効果的であり得る(Fountoulakisら、J. Biochem., 270: 3958-3964(1995))。

【0168】

(ベクター、宿主細胞、およびタンパク質産生)

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞、および組換え技術によるポリペプチドの産生に関する。例えば、ベクターは、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターであり得る。レトロウイルスベクターは、複製コンピテント、または複製欠損であり得る。後者の場合、一般にウイルス増殖は、宿主細胞を補完する(complementing)際にのみ生じる。

【0169】

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

【0170】

ポリヌクレオチド挿入物は、適切なプロモーター(いくつか挙げれば、例えば、ファージ PLプロモーター、E. coli lacプロモーター、trpプロモーター、phoAプロモーターおよびtacプロモーター、SV40初期プロモーターおよびSV40後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーター)に作動可能に連結されるべきである。他の適切なプロモーターは

当業者に公知である。発現構築物はさらに、転写開始、転写終結のための部位、および転写領域において、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。構築物によって発現される転写物のコード部分は、好ましくは、始めに翻訳開始コドン、および翻訳されるポリペプチドの末端に適切に位置される終結コドン(UAA、UGAまたはUAG)を含む。

【0171】

示されるように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも1つの選択マーカを含む。このようなマーカは、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、G418、またはネオマイシン耐性、ならびに*E. coli*および他の細菌において培養するためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適切な宿主の代表的な例は、細菌細胞(例えば、*E. coli*、*Streptomyces*および*Salmonella typhimurium*細胞);酵母細胞のような真菌細胞(例えば、*Saccharomyces cerevisiae*または*Pichia pastoris*(ATCC登録番号201178));*Drosophila S2*および*Spodoptera Sf9*細胞のような昆虫細胞;CHO細胞、COS細胞、293細胞、およびBowesメラノーマ細胞のような動物細胞;ならびに植物細胞を含むが、これらに限定されない。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は、当該分野で公知である。

【0172】

細菌における使用のために好ましいベクターの中には、pQE70、pQE60およびpQE-9(QIAGEN, Inc.から入手可能);pBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene Cloning Systems, Inc.から入手可能);ならびにptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia Biotech, Inc.から入手可能)を含む。好ましい真核生物ベクターの中には、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG(Stratageneから入手可能);ならびにpSVK3、pBPV、pMS

GおよびpSVL (Pharmaciaから入手可能)がある。酵母系における使用のために好ましいベクターは、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZalph、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K、およびPAO815 (全てInvitrogen, Carlsbad, CAから入手可能)が挙げられるが、これらに限定されない。他の適切なベクターは当業者に容易に明らかである。

【0173】

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

【0174】

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

【0175】

本発明のポリペプチドはまた、以下から回収され得る：直接単離されるかまたは培養されるかにかかわらず、体液、組織および細胞を含む天然の供給源から精製される産物；化学的合成手順の産物；ならびに、例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む、原核生物宿主または真核生物宿主から組換え技術によって産生された産物。組換え産生手順において使

用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化されてもよく、またはグリコシル化されていなくてもよい。さらに、本発明のポリペプチドはまた、宿主媒介プロセスの結果として、いくつかの場合において、最初の改変されたメチオニン残基を含み得る。従って、一般に、翻訳開始コドンによってコードされるN末端メチオニンが、すべての真核生物細胞における翻訳後の任意のタンパク質から高い効率で除去されることが、当該分野において周知である。ほとんどのタンパク質においてN末端メチオニンはまた、ほとんどの原核生物において効率的に除去されるが、いくつかのタンパク質について、この原核生物除去プロセスは、N末端メチオニンが共有結合するアミノ酸の性質に依存して、非効率的である。

【0176】

1つの実施形態において、酵母 *Pichia pastoris* は、真核細胞系において、本発明のポリペプチドを発現させるために使用される。*Pichia pastoris* は、メタノールをその唯一の炭素供給源として代謝し得るメチル栄養性 (methylotrophic) 酵母である。メタノール代謝経路における主要な工程は、 O_2 を使用してのホルムアルデヒドへのメタノールの酸化である。この反応は、酵素アルコールオキシダーゼによって触媒される。その唯一の炭素供給源としてメタノールを代謝するために、*Pichia pastoris* は、 O_2 に対するアルコールオキシダーゼの比較的低い親和性に部分的に起因して、高レベルのアルコールオキシダーゼを生成する。結果的に、主要な炭素供給源としてメタノールに依存する増殖培地において、2つのアルコールオキシダーゼ遺伝子 (AOX1) のうちの1つのプロモーター領域は、非常に活性である。メタノールの存在下で、AOX1 遺伝子から産生されるアルコールオキシダーゼは、*Pichia pastoris* における総可溶性タンパク質のうちのおよそ30%までを含む。Ellis, S. B. ら、*Mol. Cell. Biol.* 5: 1111~21 (1985); Koutz, P. J. ら、*Yeast* 5: 167~77 (1989); Tschopp, J. F. ら、*Nucl. Acids Res.* 15: 3859~76 (1987)。従って、AOX1 調節配列の全てまたは一部の転写調節下の異種コード配列 (例えば、本発明のポ

リヌクレオチドなど)は、メタノールの存在下で増殖した*Pichia*酵母において、指数関数的に高レベルで発現される。

【0177】

1つの例において、プラスミドベクターpPIC9Kは、「*Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology*」, D. R. HigginsおよびJ. Cregg編(The Humana Press, Totowa, NJ, 1998)において本質的に記載されるように、*Pichia*酵母系において、本明細書中に示されるように本発明のポリペプチドをコードするDNAを発現させるために使用される。この発現ベクターは、マルチクローニング部位の上流に位置する*Pichia pastoris*アルカリホスファターゼ(PHO)分泌シグナルペプチド(すなわち、リーダー)に連結された強力なAOX1プロモーターによって、本発明のポリペプチドの発現および分泌を可能にする。

【0178】

多くの他の酵母ベクター(例えば、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZalpha、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、およびPAO815)は、当業者が容易に理解するように、提案された発現構築物が必要とされる場合インフレームのAUGを含む転写、翻訳、分泌(所望される場合)などの適切に配置されたシグナルを提供する限り、pPIC9Kの代わりに使用され得る。

【0179】

別の実施形態において、異種コード配列(例えば、本発明のポリヌクレオチドなど)の高レベルの発現は、本発明の異種ポリヌクレオチドを発現ベクター(例えば、pGAPZまたはpGAPZalphaなど)中にクローニングし、そしてメタノールの非存在下で酵母培養物を増殖させることによって達成され得る。

【0180】

本明細書において議論されるベクター構築物を含む宿主細胞を含むことに加えて、本発明はまた、脊椎動物起源(特に、哺乳動物起源)の一次(primary

y) 宿主細胞、二次 (secondary) 宿主細胞、および不死化宿主細胞を含む。これらの宿主細胞は、内因性の遺伝物質 (例えば、コード配列) を欠失または置換するように操作されており、そして / あるいは本発明のポリヌクレオチドと作動可能に連結された遺伝物質 (例えば、異種ポリヌクレオチド配列) を含むように操作され、そして内因性のポリヌクレオチドを活性化、変更、および / または増幅する。例えば、当該分野で公知の技術は、相同組換えを介して、異種制御領域 (例えば、プロモーターおよび / またはエンハンサー) ならびに内因性ポリヌクレオチド配列を作動可能に連結するために使用され得る (例えば、1997年6月24日に発行された米国特許第5,641,670号; 1996年9月26日に公開された国際公開第WO 96/29411号; 1994年8月4日に公開された国際公開第WO 94/12650号; Kollerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); および Zijlstraら, Nature 342:435-438 (1989) を参照のこと。これらの開示の各々は、それら全体において参考として援用される)。

【0181】

さらに、本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の技術を用いて化学合成され得る (例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y. および Hunkapillerら, Nature, 310:105-111 (1984) を参照のこと)。例えば、本発明のポリペプチド配列のフラグメントに対応するポリペプチドは、ペプチド合成機の使用により合成され得る。さらに、所望の場合、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸アナログが、置換または付加としてこのポリペプチド配列に導入され得る。非古典的アミノ酸としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 通常のアミノ酸のD異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、e-Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン

、ホモシトルリン、システイン酸、t - ブチルグリシン、t - ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、b - アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナーアミノ酸（例えば、b - メチルアミノ酸）、Ca - メチルアミノ酸、Na - メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸アナログ。さらに、アミノ酸はD（右旋性）またはL（左旋性）であり得る。

【0182】

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

【0183】

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

【0184】

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

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

【0185】

このポリマーは、任意の分子量のポリマーであり得、そして分枝状であっても非分枝状であってもよい。ポリエチレングリコールに関しては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の容易さのために、約1kDaと約100kDaとの間（用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子は示した分子量よりも重く、いくつかは示した分子量よりも軽いことを示す）である。所望の治療的プロファイル（例えば、所望される持続放出の持続時間、ある場合には生物学的活性に対する効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または抗原性がないこと、および治療タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の効果）に依存して、他のサイズが用いられ得る。

【0186】

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

る。

【0187】

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

【0188】

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

【0189】

本発明によって含まれるマルチマーは、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。本明細書中で用いられる場合、用語ホモマーは、（本明細書中に記載されるポリペプチドの、フラグメント、改変体、および融合タンパク質を含む）配列番号Yのアミノ酸配列または配列番号Xもしくは配列番号Xの相補体によってコードされるアミノ酸配列および/あるいはcDNAプラスミド：Zによってコードされるアミノ酸配列に対応するポリペプチドのみを含むマルチマーをいう。これら

のホモマーは、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み得る。特定の実施形態では、本発明のホモマーは、同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドのみを含むマルチマーである。別の特定の実施形態では、本発明のホモマーは、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むマルチマーである。特定の実施形態では、本発明のマルチマーは、ホモダイマー（例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む）あるいはホモトリマー（例えば、同一または異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む）である。さらなる実施形態では、本発明のホモマー性マルチマーは、少なくともホモダイマー、少なくともホモトリマーまたは少なくともホモテトラマーである。

【0190】

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

【0191】

本発明のマルチマーは、疎水性、親水性、イオン性および/もしくは共有結合的な結合の結果であり得、そして/または例えば、リポソーム形成によって間接連結され得る。従って、1つの実施形態では、本発明のマルチマー（例えば、ホモダイマーまたはホモトリマーなど）は、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態では、本発明のヘテロマルチマー（例えば、ヘテロトリマーまたはヘテロテトラマーなど）は、本発明のタンパク質が、溶液中で本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質における異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と接触した場合に形成される。他の実施形態では、本発明のマルチマーは、本発明のポリペプチドとの、および/または本発明のポリペプチド間での共有結合によって形成される。このような共有結合は、ポリペプチド配列（例えば、配列番号Yに記載されるか、または配列番号Xによってコードされるポリペプチドおよび/またはcDNAプラスミド

: Z中に含まれる配列)に含まれる1以上のアミノ酸残基を含み得る。1例では、この共有結合は、ネイティブ(すなわち、天然に存在する)ポリペプチドにおいて相互作用するポリペプチド配列内に存在するシステイン残基間での架橋である。別の例では、この共有結合は、化学的操作または組換え操作の結果である。あるいは、このような共有結合は、融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列において含まれる1以上のアミノ酸残基を含み得る。1例では、共有結合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列間にある(例えば、米国特許第5,478,925号を参照のこと)。特定の例では、この共有結合は、(本明細書中に記載されるような)本発明のFc融合タンパク質に含まれる異種配列間にある。別の特定の例では、本発明の融合タンパク質の共有結合は、共有結合したマルチマーを形成し得る別のタンパク質(例えば、オステオプロテゲリン(osteoprotegerin)など)由来の異種ポリペプチド配列間にある(例えば、国際公開番号WO 98/49305号(この内容はその全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。別の実施形態では、2以上の本発明のポリペプチドは、ペプチドリンカーを通して連結される。例としては、米国特許第5,073,627号(本明細書中に参考として援用される)に記載されるペプチドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーによって隔てられた本発明の複数のポリペプチドを含むタンパク質は、従来の組換えDNA技術を用いて生成され得る。

【0192】

本発明のマルチマーポリペプチドを調製するための別の方法は、ロイシンジッパーポリペプチド配列またはイソロイシンジッパーポリペプチド配列に融合された本発明のポリペプチドの使用を含む。ロイシンジッパードメインおよびイソロイシンジッパードメインは、そのドメインが見出されるタンパク質のマルチマー形成を促進するポリペプチドである。ロイシンジッパーは元々、いくつかのDNA結合タンパク質において同定され(Landschulzら, Science 240:1759、(1988))、そしてそれ以来種々の異なるタンパク質において見出されている。とりわけ公知のロイシンジッパーは、ダイマー形成またはトリマー形成をする、天然に存在するペプチドおよびその誘導体である。本

発明の可溶性マルチマータンパク質を生成するために適切なロイシンジッパードメインの例は、本明細書中に参考として援用されるPCT出願WO 94/10308に記載されるロイシンジッパードメインである。溶液中でダイマー形成またはトリマー形成をするポリペプチド配列に融合された本発明のポリペプチドを含む組換え融合タンパク質は、適切な宿主細胞中で発現され、そして得られる可溶性マルチマー融合タンパク質は、当該分野で公知の技術を用いて培養上清から回収される。

【0193】

本発明のトリマーポリペプチドは、増強された生物学的活性の利点を提供し得る。好ましいロイシンジッパー部分およびイソロイシン部分は、トリマーを優先的に形成する部分である。1例は、本明細書中に参考として援用されるHopp et al. (FEBS Letters 344:191, (1994))および米国特許出願第08/446,922号に記載される通りの肺サーファクタントプロテインD (SPD) に由来するロイシンジッパーである。天然に存在するトリマータンパク質由来の他のペプチドは、本発明のトリマーポリペプチドの調製において用いられ得る。

【0194】

別の例では、本発明のタンパク質は、Flag (登録商標) ポリペプチド配列を含む本発明の融合タンパク質に含まれるFlag (登録商標) ポリペプチド配列間の相互作用によって結合される。さらなる実施形態では、本発明のタンパク質は、本発明のFlag (登録商標) 融合タンパク質に含まれる異種ポリペプチド配列と抗Flag (登録商標) 抗体との間の相互作用によって結合する。

【0195】

本発明のマルチマーは、当該分野で公知の化学技術を使用して生成され得る。例えば、本発明のマルチマーに含まれることが所望されるポリペプチドは、当該分野で公知のリンカー分子およびリンカー分子長最適化技術を使用して、化学的に架橋され得る(例えば、米国特許第5,478,925号(これは本明細書中に参考として援用される))を参照のこと)さらに、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の技術を使用して生成されて、マルチマー中に含まれることが所望さ

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

【0196】

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

【0197】

(抗体)

さらに、本発明のポリペプチドは、(特異的な抗体抗原結合をアッセイするための当該分野で周知のイムノアッセイによって決定されるような)本発明の配列番号Yの、ポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、または改変体、および/またはエピトープに免疫特異的に結合する抗体およびT細胞抗原レセプター(TCR)に関する。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって産生されるフラグメント、抗イデオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む)、および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを含むが、限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、免疫特異的に抗原に結合する抗原結合部位を含む分子をいう。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、任意のクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)または任意のサブクラスであり得る。

【0198】

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

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

【0199】

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

【0200】

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

【0201】

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

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

【0202】

本発明はまた、競合性結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法（例

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

【0203】

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

【0204】

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

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

【0205】

本発明の抗体は、例えば、これらに限定されないが、本発明のポリペプチドを精製し、検出し、そして標的化するために使用され得る。これらは、インビトロおよびインビボの両方での診断方法および治療方法を含む。例えば、この抗体は、生物学的サンプルにおける本発明のポリペプチドのレベルを定性的におよび定

量的に測定するためのイムノアッセイにおける使用を有す。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988) (本明細書中でその全体が参照として援用される)を参照のこと。

【0206】

以下にさらに詳細に議論されるように、本発明の抗体は、単独または他の化合物との組み合わせのいずれかで使用され得る。この抗体はさらに、ポリペプチドまたは他の化合物へN末端でもしくはC末端で異種ポリペプチドに組換え的に融合され得るか、または化学的に結合(共有結合および非共有結合を含む)され得る。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子および異種ポリペプチド、薬剤、放射性核種、または毒素のようなエフェクター分子へ組換え的に融合または結合され得る。例えば、PCT公開WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; 米国特許第5,314,995号; および欧州特許第396,387号を参照のこと。

【0207】

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

【0208】

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法によって産生され得る。

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

【0209】

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

【0210】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生およびスクリーニングする方法

は、当該分野で慣用的かつ周知であり、そして実施例に詳細に議論される。非限定的な実施例において、マウスは、本発明のポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現する細胞を用いて免疫され得る。一旦免疫応用が検出される（例えば、抗原に特異的な抗体がマウスの血清中に検出される）と、マウスの脾臓を収集しそして脾細胞を単離する。次に、その脾細胞を周知の技術によって任意の適切な骨髓腫細胞（例えば、ATCCから入手可能な細胞株SP20由来の細胞）に融合させる。ハイブリドーマを限界希釈によって選択およびクローン化する。次に、ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌する細胞について、当該分野で公知の方法によってアッセイする。一般的に高いレベルの抗体を含む腹水（ascites fluid）が、陽性ハイブリドーマクローンをを用いてマウスを免疫させることによって、産生され得る。

【0211】

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

【0212】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術により産生し得る。例えば、本発明のFabフラグメントおよびF(ab')₂フラグメントは、パパイン（Fabフラグメントを産生するため）またはペプシン（F(ab')₂フラグメントを産生するため）のような酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解性切断によって産生され得る。F(ab')₂フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のCH1ドメインを含む。

【0213】

例えば、本発明の抗体はまた、当該分野に公知の種々のファージディスプレイ方法を用いて産生され得る。ファージディスプレイ方法において、機能的な抗体

ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面上に提示される。特定の実施形態において、このようなファージを、レパートリー抗体ライブラリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用し得る。目的の抗原と結合する抗原結合ドメインを発現するファージを、抗原を用いて、（例えば、標識化抗原、あるいは固体表面または固体ビーズへ結合または捕捉された抗原を使用して）選択または同定し得る。これらの方法において使用されるファージは、代表的に、ファージ遺伝子IIIタンパク質またはファージ遺伝子VIIタンパク質のいずれかに組換え的に融合されたFab、Fvまたはジスルフィド安定化されたFvの抗体ドメインを有するファージから発現されたfdおよびM13結合ドメインを含む糸状（filamentous）ファージである。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられる：Brinkmanら、J. Immunol. Methods 182:41~50(1995)；Amesら、J. Immunol. Methods 184:177~186(1995)；Kettleboroughら、Eur. J. Immunol. 24:952~958(1994)；Persicら、Gene 187:9~18(1997)；Burtonら、Advances in Immunology 57:191~280(1994)；PCT公開 PCT/GB91/01134；PCT公開 WO90/02809；WO91/10737；WO92/01047；WO92/18619；WO93/11236；WO95/15982；WO95/20401；ならびに米国特許第5,698,426号；同第5,223,409号；同第5,403,484号；同第5,580,717号；同第5,427,908号；同第5,750,753号；同第5,821,047号；同第5,571,698号；同第5,427,908号；同第5,516,637号；同第5,780,225号；同第5,658,727号；同第5,733,743号および同第5,969,108号（これらのそれぞれは、その全体が参考として援用される）。

【0214】

上記参考文献に記載されているように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体をコードする領域は、ヒト抗体を含む抗体の全体、または任意の他の所望の抗原結合フラグメントを作製するために単離および使用され得、そして例えば、以下に詳細に記載されるように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主において発現され得る。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントを組換え的に産生するための技術はまた、当該分野で公知の方法を用いて使用され得る。この方法は、例えば、以下に開示される方法である：PCT公開WO92/22324；Mullinaxら、Bio Techniques 12(6)：864-869(1992)；およびSawaiら、AJRI 34：26-34(1995)；およびBetterら、Science 240：1041-1043(1998)(上記の参考文献は、その全体が参考として援用される)。

【0215】

単鎖のFvsおよび抗体を産生するために用いられ得る技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号；Hustonら、Methods in Enzymology 203：46-88(1991)；Shuら、PNAS 90：7995-7999(1993)；およびSkerraら、Science 240：1038-1040(1988)に記載される技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボ使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の使用が好ましくあり得る。キメラ抗体は、この抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子(例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体)である。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野において公知である。例えば、Morrison, Science 229：1202(1985)；Oiら、Bio Techniques 4：214(1986)；Gilliesら、(1989) J. Immunol. Methods 125：191-202；および米国特許第5,807,715号；同第4,816,567号；および同第4,816,397号を参照のこと(これらは、本明細書中でその全体が参照として援用される)。ヒ

ト化抗体は、非ヒト種由来の1以上の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望の抗原に結合する、非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域におけるフレームワーク残基は、CDRドナー抗体由来の対応する残基と置換され、抗原結合を改変(好ましくは、改善)する。これらのフレームワーク置換は、当該分野で周知の方法により同定され、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基との相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較による。(例えば、Queenら、米国特許第5,585,089号;Riechmannら、Nature 332:323(1988)(これらは本明細書中でその全体が参考として援用される)を参照のこと)。抗体は、例えば、以下を含む当該分野で公知の種々の技術を用いてヒト化され得る:CDR-グラフティング(grafting)(欧州特許第239,400号;PCT公開WO91/09967;米国特許第5,225,539号;同第5,530,101号および同第5,585,089号)、ベニヤリング(veneering)またはリサーフェイシング(resurfacing)(欧州特許第592,106号;欧州特許第519,596号;Padlan、Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991);Studnickaら、Protein Engineering 7(6):805-814(1994);Roguskaら、PNAS 91:969-973(1994))、およびチェーンシャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)。

【0216】

完全なヒト抗体が、ヒト患者の治療的処置に対して特に望ましい。ヒト抗体は、当該分野で公知の種々の方法によって作製され得、これらの方法としては、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを用いる上記のファージディスプレイ方法が挙げられる。米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号;ならびにPCT公開WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO

96/33735、およびWO91/10741（これらの各々は、その全体が参考として本明細書中に援用される）もまた参照のこと。

【0217】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンの発現は出来ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子およびヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体は、無作為にまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域 (diversity region) は、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン座の導入と別々にまたは同時に非機能的にされ得る。特に、JH領域のホモ接合性の欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。この改変された胚性幹細胞を増殖させ、そして胚盤胞に微量注入して、キメラマウスを産生する。次に、このキメラマウスを、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を産生するために繁殖させる。トランスジェニックマウスを、選択された抗原（例えば、本発明のポリペプチドの全体または一部）を用いて通常の様式で免疫する。その抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いた免疫したトランスジェニックマウスから得られ得る。ヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間のトランスジェニックマウスの再編成によってかくまわれ (harbored)、そしてその後、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。従って、そのような技術の使用によって、治療的に有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体の産生が可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、LonbergおよびHuszar、Int. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995) を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術のならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な議論については、例えば、PCT公開WO98/24893; WO92/01047; WO96/34096; WO96/33735; 欧州特許第0598 877; 米国特許第5,413,923号; 同第5,625,126号

；同第5，633，425号；同第5，569，825号；同第5，661，016号；同第5，545，806号；同第5，814，318号；同第5，885，793号；同第5，916，771号；および同第5，939，598号を参照のこと（これらは、その全体が本明細書中に参考として援用される）。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Genpharm (San Jose, CA) のような企業は、上記の技術に類似した技術を用いて選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事し得る。

【0218】

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

【0219】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、当業者に周知の技術を用いて、本発明のポリペプチドを「模倣する」抗イディオタイプ抗体を生成するために順々に利用され得る。（例えば、GreenspanおよびBona、FASEB J. 7(5):437-444(1989)；ならびにNissinoff、J. Immunol. 147(8):2429-2438(1991)を参照のこと）。例えば、結合し、そしてポリペプチドのマルチマー化 (multimerization) および/または本発明のポリペプチドのリガンドに対する結合を競合的に阻害する抗体を用いて、このポリペプチドのマルチマー化および/または結合ドメインを「模倣し」、そして結果として、ポリペプチドおよび/またはそのリガンドに結合し、そして中和する抗イディオタイプを生成し得る。このような中和抗イディオタイプまたはこのような抗イディオタイプのFabフラグメントは、治療レジメンにおいて使用されて、ポリペプチドリガンドを中和し得る。例えば、このような抗イディオタイプ抗体を使用して、本発明のポリペプチドを結合し得るか、そして/またはそのリガンド/レセプターを結合し得、それによって、その生物学的活性をブロックし得る。

【0220】

(抗体をコードするポリヌクレオチド)

本発明はさらに、本発明の抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ストリンジェントな条件下またはより低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で(例えば、上記のような)、抗体(好ましくは、本発明のポリペプチドへ特異的に結合する抗体)をコードするポリヌクレオチド、好ましくは、配列番号2および/または4のアミノ酸配列を有するポリヌクレオチドに結合する抗体をコードするポリヌクレオチド、に対してハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【0221】

当該分野で公知の任意の方法によって、これらのポリヌクレオチドが得られ得、そしてこれらポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、決定され得る。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知である場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアSEMBルされ得(例えば、Kutmeierら、BioTechniques 17:242(1994)に記載されるように)、これは、手短に言えば、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニリングおよび連結、ならびに次いでPCRによるこの連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0222】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源からの核酸から作製され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源(例えば、抗体cDNAライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞(例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞)から生成されたcDNAライブラリー、またはそれから単離された核酸(好ましくはポリA+RNA))を、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために、その配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プラ

イマーを使用するPCR増幅によって、またはその特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得られ得る。PCRによって作製された増幅された核酸は、次いで、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

【0223】

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

【0224】

特定の実施形態では、重鎖および/または軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域(CDR)の配列を同定するために、当該分野で周知の方法、例えば、他の重鎖および軽鎖の可変領域の既知のアミノ酸配列を比較して、配列超可変性領域を決定する方法、によって、調べられ得る。慣用的組換えDNA技術を使用して、一つ以上のCDRが、フレームワーク領域内、例えば、上記のように、非ヒト抗体をヒト化させるためにヒトフレームワーク領域内に挿入され得る。このフレームワーク領域は、天然に存在、または共通するフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る(ヒトフレームワーク領域の一覧については、例えばChothiaら、J. Mol. Biol. 278:457-479(1998)を参照のこと)。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組合せによって生成するポリヌクレオチドは、

本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上で考察したように、一つ以上のアミノ酸の置換は、フレームワーク領域内で起こり、そして好ましくは、このアミノ酸置換は、その抗原への抗体の結合を改善する。さらに、このような方法は、アミノ酸置換させるため、または鎖内ジスルフィド結合に参加している一つ以上の可変領域システイン残基を欠失させて、一つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠けた抗体分子を生成させるために、使用され得る。ポリペプチドに対する他の改変は、本発明および当該分野の技術によって達成される。

【0225】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子からの遺伝子とともに、スプライシングすることによる、「キメラ抗体」(Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851 - 855 (1984); Neubergerら、Nature 312: 604 - 608 (1984); Takedaら、Nature 314: 452 - 454 (1985))の産生のために開発された技術が、使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物の種に由来する分子(例えばマウスmAbに由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する分子)であり、例えばヒト化抗体である。

【0226】

あるいは、一本鎖抗体の産生について記載された技術(米国特許第4,946,778号; Bird, Science 242: 423 - 42 (1998); Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883 (1998); およびWardら、Nature 334: 544 - 54 (1989))は、一本鎖抗体を産生するために適合され得る。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介して、Fv領域の重鎖および軽鎖フラグメントを連結し、一本鎖ポリペプチドを生じることによって形成される。E. coliにおける機能的Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた使用され得る(Skerraら、Science 242: 1038 - 1041 (1988))。

【0227】

(抗体産生の方法)

本発明の抗体は、抗体の合成について当該技術分野で公知の方法によって、特に化学合成によって、または好ましくは組換え発現技術によって、産生され得る。

【0228】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導體もしくはアナログ(例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖、または本発明の一本鎖抗体)の組換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築を必要とする。本発明の、抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはそれらの部分(好ましくは重鎖もしくは軽鎖の可変ドメインを含む)をコードするポリヌクレオチドが一旦得られれば、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を使用する組換えDNA技術によって産生され得る。従って、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含むポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書中に記載される。当業者に周知の方法は、抗体コード配列ならびに適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築するために使用され得る。これらの方法は、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えを含む。従って、本発明は、本発明の抗体分子をコードするヌクレオチド配列、またはその重鎖もしくは軽鎖、またはプロモーターに作動可能に連結された、重鎖もしくは軽鎖の可変ドメイン、を含む複製可能ベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含み(例えば、PCT国際公開第WO 86/05807号; PCT国際公開第WO 89/01036; および米国特許第5,122,464号を参照のこと。)、そして、この抗体の可変領域は、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクター内にクローニングされ得る。

【0229】

発現ベクターは、従来の技術によって宿主細胞に移入され、次いでトランスフェクト細胞は、従来の技術によって本発明の抗体を産生するために培養される。従って、本発明は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、またはその重鎖もしくは軽鎖、または異種のプロモーターに作動可能に連結された、本発明の

一本鎖抗体を含む宿主細胞を含む。二本鎖抗体の発現のための好ましい実施形態では、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、下記の詳細のように、免疫グロブリン分子全体の発現のための宿主細胞において共発現され得る。

【0230】

種々の宿主発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現させるために利用され得る。このような宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、かつ続いて精製され得るビヒクルを表わすが、また、適切なヌクレオチドをコードする配列で形質転換またはトランスフェクトされる場合に、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を表わす。これらには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列を含む組換えバクテリオファージDNA発現ベクター、プラスミドDNA発現ベクターまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*）のような微生物；抗体をコードする配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；抗体をコードする配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、*CaMV*；タバコモザイクウイルス、*TMV*）に感染した植物細胞系または抗体をコードする配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、*Ti*プラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいは哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物のウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えば、*COS*、*CHO*、*BHK*、*293*、*3T3*細胞）。好ましくは、*Escherichia coli*のような細菌細胞、そしてより好ましくは、特に、組換え抗体分子全体の発現のために真核生物細胞が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要最初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わせられた、チャイニーズハムスターの卵巣細胞（*CHO*）のような哺乳動物細胞が、抗体のための効果的な発現系である（*Foeckingら*、*Gene* 45:10

1 (1986); Cockettら、Bio/Technology 8:2 (1990)。

【0231】

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

【0232】

昆虫系においては、*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (*AcNPV*) は、異種遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda* 細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウイルスの非必須の領域 (例えばポリヘドリン遺伝子) に個々にクローニングされ得、そして *AcNPV* プロモーター (例えばポリヘドリンプロモーター) の制御下に配置され得る。

【0233】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウィルスに基づく発現系が利用され得る。アデノウィルスが発現ベクターとして使用される場合においては、目的の抗体をコードする配列は、アデノウィルスの転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび3つの部分に分かれるリーダー配列、に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボでの組換えによって、アデノウィルスゲノムに挿入され得る。ウィルスのゲノムの非必須領域（例えば、E1またはE3領域）における挿入は、生存可能で、感染した宿主において抗体分子を発現する能力のある組換えウィルスを生じる（例えば、Logan & Shenk、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984) を参照のこと）。特異的開始シグナルはまた、挿入された抗体をコードする配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、この開始コドンは、挿入部分全体の翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレーム（reading frame）と相が同じでなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、種々の起源、天然および合成の両方であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター、などの含有によって高められ得る（Bittnerら、Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987) を参照のこと）。

【0234】

さらに、宿主細胞系統は、選択され得、これは挿入配列の発現を調節するか、または所望される特異的な様式で遺伝子産物を改変し、そしてプロセッシングする。タンパク質産物のこのような改変（例えばグリコシル化）およびプロセッシング（例えば切断）は、タンパク質の機能のために重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の、翻訳後プロセッシングおよび改変のための、特徴的で特異的な機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現された外来タンパク質の正確な改変およびプロセッシングを確実にするように選択され得る。この目的のために、遺伝子産物の、第一の転写、グリコシル化、およびリン酸化の正確なプロセッシングのための細胞機構を有する、真核生物宿主細胞が、使用さ

れ得る。このような哺乳動物宿主細胞は、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、そして特に、例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47Dのような乳癌細胞株、ならびに、例えば、CRL7030およびHs578Bstのような正常な乳腺細胞株、を含むがこれらに限定されない。

【0235】

組換えタンパク質の長期間の高収率産生、安定発現が好ましい。例えば、安定に抗体分子を発現する細胞株が操作され得る。ウィルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、など）、および選択可能なマーカーによって制御されるDNAで形質転換され得る。外来DNAの導入に続いて、操作された細胞は、1～2日間富化培地で増殖させられ得、次いで、選択培地に切り替えられる。組換えプラスミドにおける選択可能マーカーは、選択したものに耐性を与え、そして細胞が、プラスミドをその染色体内に安定に組み込み、そして増殖して、細胞増殖巣を形成し、これを今度はクローニングし得、細胞株に拡張され得ることを可能にする。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために、有利に使用され得る。このような操作された細胞株は、直接的または間接的に抗体分子と相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において、特に有用であり得る。

【0236】

多数の選択系が使用され得、この選択系は、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、Cell 11:223(1977))、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202(1992))、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、Cell 22:817(1980))を含むがこれらに限定されず、これらの遺伝子は、tk-、hgprt-またはaprt-細胞においてそれぞれ使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子の選択の根拠として使用され得る：dhfr、これはメトトレキサートに対する耐性を与える(Wig

lerら、*Natl. Acad. Sci. USA* 77:357(1980); O'Hareら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527(1981)); gpt、これはミコフェノール酸にに対する耐性を与える(Mulligan&Berg、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072(1981)); neo、これはアミノグリコシドG-418に対する耐性を与える(*Clinical Pharmacy* 12:488-505; WuおよびWu、*Biotherapy* 3:87-95(1991)); Tolstoshev、*Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596(1993); Mulligan、*Science* 260:926-932(1993); ならびにMorganおよびAnderson、*Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217(1993); 1993年5月、*TIB TECH* 11(5):155-215); ならびにhygro、これはハイグロマイシンにに対する耐性を与える(Santereら、*Gene* 30:147(1984))。組換えDNA技術の分野で通常知られている方法は、所望の組換えクローンを選択するために、慣用的に適用され得、そしてこのような方法は、以下に記載されている: 例えば、Ausubelら(編)、*Current Protocols in Molecular Biology*、John Wiley&Sons、NY(1993); Kriegler、*Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*、Stockton Press、NY(1990); ならびに12章および13章、Dracopolisら(編)、*Current Protocols in Human Genetics*、John Wiley&Sons、NY(1994); Colberre-Garapinら、*J. Mol. Biol.* 150:1(1981)(これらはその全体が本明細書中に参考として援用される)。

【0237】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大され得る(総説として、BebbingtonおよびHentschel、*The use of vectors based on gene amplification fo*

r the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)を参照のこと)。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが、増幅可能であると、宿主細胞の培養物に存在するインヒビターのレベルにおける増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加する。増副領域は抗体遺伝子と結合しているので、抗体の産生もまた増加する(Crouseら、Mol. Cell. Biol. 3:257(1983))。

【0238】

宿主細胞は、本発明の二つの発現ベクター(重鎖由来のポリペプチドをコードする第一のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第二のベクター)で、同時トランスフェクトされ得る。この二つのベクターは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの等しい発現を可能にする、同一の選択可能なマーカーを含み得る。あるいは、単一のベクターが使用され得、これは重鎖および軽鎖両方のポリペプチドをコードし、そして発現することができる。このような状況において、過剰の毒性の遊離重鎖を避けるために、重鎖の前に軽鎖が配置されるべきである(Proudfoot、Nature 322:52(1986); Kohler、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197(1980))。重鎖および軽鎖のためのコード配列はcDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

【0239】

一旦本発明の抗体分子が、動物によって産生されるか、化学的に合成されるか、または組換えにより発現されると、当該分野で公知の、免疫グロブリン分子の精製のための任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー(特に、プロテインAの後に特異的抗原に対するアフィニティーによる)、およびサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製のための任意の他の標準的な技術によって、精製され得る。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、本明細書中に記載されるかまたはそうでなければ当該分野において公知の、異種ポリペプチド配列に融合され

得、精製を容易にする。

【0240】

本発明は、組換えにより融合されるかまたは化学的に、本発明のポリペプチド（もしくはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個のアミノ酸）に結合されて（共有結合および非共有結合の両方を含む）、融合タンパク質を生成する抗体、を含む。この融合は、直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。この抗体は、本発明のポリペプチド（またはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個のアミノ酸）以外の抗原に特異的であり得る。例えば、インビトロまたはインビボのいずれにおいても、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面のレセプターに特異的な抗体に融合または結合させることによって、特定の細胞のタイプに対して、本発明のポリペプチドを標的にするために、抗体が使用され得る。本発明のポリペプチドに融合または結合される抗体はまた、インビトロ免疫アッセイおよび当該分野で公知の方法を使用する精製方法において使用され得る。例えば、Harborら、上記、およびPCT公開第WO93/21232号；EP439,095；Naramuraら、Immunolett. 39:91-99(1994)；米国特許第5,474,981号；Gilliesら、PNAS89:1428-1432(1992)；Fellら、J. Immunol. 146:2446-2452(1991)を参照のこと。これらは、その全体が参考として援用される。

【0241】

本発明はさらに、可変領域以外の抗体のドメインに融合または結合された、本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のFc領域、またはその部分に融合または結合され得る。この抗体の本発明のポリペプチドに融合された部分は、定常領域、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、またはそのドメイン全体もしくは部分任意の組合せを含み得る。これらのポリペプチドはまた、上記の抗体の部分に融合または結合され得、多重体を形成する。例えば、本発明のポリペプチドに融合さ

れたFc部分は、このFc部分の間のジスルフィド結合を通して二量体を形成し得る。より高度の多重体形態は、ポリペプチドをIgAおよびIgMの部分に融合させることによって作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合させるための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第5,336,603号；同第5,622,929号；同第5,359,046号；同第5,349,053号；同第5,447,851号；同第5,112,946号；EP 307,434；EP 367,166；PCT公開第WO96/04388号；第WO91/06570号；Ashkenaziら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539(1991)；Zhengら、J. Immunol. 154:5590-5600(1995)；およびVilら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341(1992)(前記の参考文献はその全体が参考として援用される)を参照のこと。

【0242】

上で考察されたように、配列番号Yのポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、または変異体、に対応するポリペプチドは、このポリペプチドのインビボ半減期を増大させるため、または当該分野で公知の方法を使用する免疫アッセイにおいて使用するために、上記の抗体部分に融合または結合され得る。さらに、配列番号Yに対応するポリペプチドを、上記の抗体部分に融合または結合して、精製を容易にし得る。1つの報告された例は、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメイン、および哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載している(EP 394,827；Trauneckerら、Nature 331:84-86(1988))。ジスルフィド連結二量体構造(IgGに起因する)を有する抗体に融合または結合される、本発明のポリペプチドもまた、単量体分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子に結合しそして中和するのにさらに効率的であり得る(Fountoulakisら、J. Biochem. 270:3958-3964(1995))。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改良された薬物動態学

的な特性を生じ得る (EP A 232, 262)。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Fc部分を欠失させることが望ましい。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Fc部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、hIL-5のようなヒトタンパク質は、hIL-5のアンタゴニストを同定するための高スループットスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されてきた (Bennettら、J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); Johansonら、J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995) を参照のこと)。

【0243】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけヘキサ-ヒスチジンペプチド (例えば、pQEベクター (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) において提供されるタグ) であり、これらの多くは市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989) に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ (Wilsonら、Cell 37:767 (1984))、および「flag」タグを含むが、これに限定されない。

【0244】

本発明は、診断剤または治療剤に結合される、抗体またはそのフラグメントをさらに含む。抗体は、例えば、臨床上の試験手順 (例えば、所定の処置レジメンの効力を決定するため) の一部として、腫瘍の発生または進行をモニターするために、診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と連結させることによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子放射断層撮影を使用する陽電子放射金属、および非放射性常磁性金属イオン、が挙げられる

。この検出可能な物質は、抗体（またはそのフラグメント）に対して、直接的または間接的のいずれかで、当該分野で公知の技術を使用する媒介物（例えば、当該分野で公知のリンカーなど）を介して、連結または結合され得る。例えば、本発明に従う診断薬としての使用のための抗体に結合され得る金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照のこと。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；ならびに、適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In または ^{99}Tc が挙げられる。

【0245】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、治療用部分（例えば細胞毒（例えば細胞増殖抑制性もしくは細胞殺傷性の薬剤））、治療剤または放射性金属イオン（例えば、 α -エミッター（例えば ^{213}Bi ））に結合され得る。細胞毒または細胞毒性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。例としては、パクリタキセル（paclitaxol）、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド（tenoposide）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン（dihydroxy anthracin dione）、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらのアナログまたはホモログ、が挙げられる。治療剤は、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、クロ

ルメチン (mechlorethamine)、チオエパ (thioepa) クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびに cis - ジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン (例えば、ダウノルビシン (以前はダウノマイシン) およびドキソルビシン)、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン (以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (anthramycin) (AMC))、ならびに抗有糸分裂剤 (例えばビンクリスチンおよびビンブラスチン)、を含むが、それらに限定されない。

【0246】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を改変するために使用され得、治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、毒素 (例えばアブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素) ; タンパク質 (例えば、腫瘍壊死因子、 α - インターフェロン、 β - インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス剤 (例えば、TNF - α 、TNF - β 、AIM I (国際公開第WO97/33899号を参照のこと)、AIM II (国際公開第WO97/34911号を参照のこと)、Fasリガンド (Takahashiら、Int. Immunol. 6 : 1567 - 1574 (1994))、VEGI (国際公開第WO99/23105号を参照のこと))、血栓症薬もしくは抗脈管形成薬 (例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン) ; または生物学的応答改変剤 (例えばリンホカイン、インターロイキン - 1 (「IL - 1」)、インターロイキン - 2 (「IL - 2」)、インターロイキン - 6 (「IL - 6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM - CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G - CSF」)、または他の増殖因子など)、が挙げられ得る。

【0247】

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

【0248】

このような治療部分を抗体に結合体化する技術は周知であり、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら(編)、243-56頁(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」Controlled Drug Delivery(第2版)、Robinsonら(編)、623-53頁(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら(編)、475-506頁(1985); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら(編)、303-16頁(Academic Press 1985)、およびThorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev. 62: 119-58(1982)を参照のこと。

【0249】

あるいは、抗体は第二の抗体に結合され、米国特許第4,676,980号(これは、その全体が本明細書に参考として援用される)におけるSegalによる記載のような抗体異種結合体を形成し得る。

【0250】

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

【0251】

(免疫表現型分類 (immunophenotyping))

本発明の抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の翻訳生成物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および/または成熟の種々の段階で差示的に発現される細胞マーカーとして有用であり得る。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対するモノクローナル抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクローナル抗体を用いて使用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス(すなわち、プレート)に付着した抗体を用いる「パニング」、ならびにフローサイトメトリー(例えば、米国特許第5,985,660号;およびMorrissonら、Cell, 96:737-49(1999)を参照のこと)が挙げられる。

【0252】

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

【0253】

(抗体結合についてのアッセイ)

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

【0254】

免疫沈降プロトコルは、一般に、タンパク質ホスファターゼインヒビターおよび/またはプロテアーゼインヒビター(例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジン酸ナトリウム)を補充したRIPA緩衝液(1% NP-40またはTriton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム(pH7.2)、1% Trasylol)のような溶解緩衝液中で、細胞の集団を溶解する工程、目的の抗体を細胞溶解物に添加する工程、一定時間(例えば、1~4時間)でインキュベートする工程、プロテインAセファロースビーズおよび/またはプロテインGセファロースビーズを細胞溶解物に添加する工程、約1時間以上でインキュベートする工程、溶解緩衝液中でビーズを洗浄する工程、およびSDS/サンプル緩衝液中でビーズを再懸濁する工程を包含する。目的の抗体が特定の抗原を免疫沈降する能力は、例えば、ウエスタンブロット分析により、

評価され得る。当業者は、抗体の抗原への結合を増加するように、そしてバックグラウンドを減少させるように改変され得るパラメータ（例えば、セファロースビーズを用いて細胞溶解物を事前にきれいにする工程）に関して、認識し得る。免疫沈降プロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編，1994、Current Protocols in Molecular Biology，第1巻、John Wiley & Sons、Inc.，New York，10.16.1を参照のこと。

【0255】

ウエスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製する工程、ポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じた8%～20% SDS-PAGE）中でのそのタンパク質サンプルの電気泳動、そのタンパク質サンプルをそのポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、PVDFまたはナイロンのような膜に転写する工程、ブロッキング溶液（例えば、3% BSAまたは脱脂粉乳を有するPBS）中でその膜をブロックする工程、洗浄緩衝液（例えば、PBS-Tween 20）中でその膜を洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希釈された一次抗体（目的の抗体）を用いてその膜をブロックする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ブロッキング緩衝液中で希釈された酵素基質（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）あるいは放射性分子（例えば、 ^{32}P または ^{125}I ）に結合体化された二次抗体（一次抗体を認識する、例えば、抗ヒト抗体）を用いて、その膜をブロックする工程、洗浄緩衝液中でその膜を洗浄する工程、ならびにその抗原の存在を検出する工程を包含する。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように、そしてバックグラウンドノイズを減少させるように改変され得るパラメータに関して、認識し得る。ウエスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology，第1巻、John Wiley & Sons，Inc.，New York，10.8.1を参照のこと。

【0256】

ELISAは、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイタープレートの

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

【0257】

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

【0258】

（治療用途）

本発明はさらに、抗体ベースの治療に関し、この治療は、1つ以上の開示され

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

【0259】

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

【0260】

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

【0261】

本発明の抗体は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線療法、化学療

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

【0262】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド(それらのフラグメントを含む)に対するイムノアッセイ、およびそれらに関連した障害の治療の両方のために、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する、高親和性および/または強力な、インビボでの阻害抗体および/または中和抗体、それらのフラグメント、またはその領域を使用することが好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド(それらのフラグメントを含む)に対して親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 、および 10^{-15}M よりも小さい解離定数すなわち K_d を有する結合親和性が挙げられる。

【0263】

(遺伝子治療)

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

【0264】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明に従って使用

され得る。例示的な方法が以下に記載される。

【0265】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, *Clinical Pharmacy* 12:488-505(1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3:87-95(1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596(1993); Mulligan, *Science* 260:926-932(1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217(1993); May, *TIBTECH* 11(5):155-215(1993)を参照のこと。使用され得る、組換えDNA技術分野において一般的に公知である方法は、Ausubelら(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY(1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY(1990)に記載される。

【0266】

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

この核酸配列は、この抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする配列またはそのフラグメントを含む。

【0267】

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

【0268】

特定の実施形態において、核酸配列はインビボで直接的に投与され、そこで核酸配列は発現されて、コードされた生成物を産生する。これは、当該分野で公知の多数の方法（例えば、それらを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれを細胞内になるように投与することにより（例えば、欠損性または弱毒化したレトロウイルスまたは他のウイルスベクター（米国特許第4,980,286号を参照のこと）を用いた感染により）、あるいは、裸のDNAの直接注射により、あるいは、微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic、Dupont）の使用により、あるいは脂質または細胞表面レセプターまたはトランスフェクト剤でコーティングするか、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中へのカプセル化により、あるいは、核に入ることが公知であるペプチドと結合させて投与することにより、レセプター媒介のエンドサイトーシスを受けるリガンドと結合させて投与することにより（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)を参照のこと）（レセプターを特異的に発現する細胞の型を標的にするために用いられ得る）などのいずれかにより達成され得る。別の実施形態において、核酸-リガンド複合体が形成され得、ここで、リガンドはエンドソームを破壊するフソジェニック（fusogenic）ウイルス性ペプチドを含み、核酸がリソソーム分解を回避することを可能にする。さらに別の実施形態において、核酸は、特異的なレセプターを標的化することにより、細胞特異的な取り込みおよび発現についてインビボで標的化され得る（例えば、PCT公開第WO92/06180号

;同第WO92/22635号;同第WO92/20316号;同第WO93/14188号、同第WO93/20221号を参照のこと)。あるいは、核酸は、細胞内部に導入され得、そして相同組換えにより、発現のために宿主細胞DNA中に組み込まれ得る(KollerおよびSmithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935(1989); Zijlstraら, Nature 342:435-438(1989))。

【0269】

特定の実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る(Millerら, Meth. Enzymol. 217:581-599(1993))を参照のこと)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルス性ゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組込みのために必要な構成要素を含む。遺伝子治療において使用される抗体をコードする核酸配列は、一つ以上のベクター中にクローン化され、これは、患者内への遺伝子の送達を容易にする。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、Boesenら, Biotherapy 6:291-302(1994)(これは、幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、mdr1遺伝子を造血性幹細胞に送達するための、レトロウイルスベクターの使用を記載する)に見出され得る。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献は、以下である:Clowesら, J. Clin. Invest. 93:644-651(1994); Kiemら, Blood 83:1467-1473(1994); SalmonおよびGunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141(1993);ならびにGrossmanおよびWilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114(1993)。

【0270】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、特に、気道上皮へ遺伝子を送達するための魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、自然に気道上皮に感染し、そこで軽い疾患を

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

【0271】

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

【0272】

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

【0273】

この実施形態においては、得られた組換え細胞のインビボ投与の前に、核酸が細胞に導入される。このような導入は、当該分野において公知の任意の方法により実施され得、それらの方法としては以下が挙げられるがこれらに限定されない

：トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介の遺伝子移入、マイクロセル(microcell)媒介の遺伝子移入、スフェロプラスト融合など。外来遺伝子の細胞への導入については、当該分野において多数の技術が公知であり(例えば、LoefflerおよびBehr, Meth. Enzymol. 217:599-618(1993); Cohenら, Meth. Enzymol. 217:618-644(1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m(1985)を参照のこと)、そしてレシピエント細胞の必要な発生的および生理学的機能が破壊されない場合、本発明に従って使用され得る。この技術は、核酸の細胞への安定した移入を提供するはずであり、その結果、核酸は、細胞により発現可能であり、そして好ましくは、その細胞の子孫により遺伝性でかつ発現可能である。

【0274】

得られた組換え細胞は、当該分野において公知の様々な方法により、患者へ送達され得る。組換え血球(例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞)は、好ましくは、静脈内に投与される。使用が考えられる細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、そして当業者により決定され得る。

【0275】

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

【0276】

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

【0277】

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

【0278】

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

【0279】

(治療活性または予防活性の証明)

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

に対するそのような化合物の効果が観察される。

【0280】

(治療的/予防的な投与および組成物)

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

【0281】

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

【0282】

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

することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアゾール化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

【0283】

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

【0284】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リポソーム中へ送達され得る（Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treatise, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler（編）, Liss, New York, 353~365頁(1989); Lopez-Berestein, 同書317~327頁を参照のこと；広く同書を参照のこと）。

【0285】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は制御された放出システム中で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る（Langer（前出）；Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987)；Buchwaldら, Surgery 88:507(1980)；Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574(1989)を参照のこと）。別の実施形態において、ポリマー材料が用いられ得る（Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise（編）, CRC Press., Boca Raton, Florida(1974)；Controlled

ed Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall (編), Wiley, New York (1984); RangerおよびPeppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61 (1983)を参照のこと; Levyら, Science 228: 190 (1985); Duringら, Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howardら, J. Neurosurg. 71: 105 (1989)もまた参照のこと)。さらに別の実施形態において、制御された放出システムは、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、全身用量の一部のみを必要とする(例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release (前出), 第2巻, 115~138頁(1984)を参照のこと)。

【0286】

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

【0287】

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

【0288】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の化合物、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。具体的な実施形態において、用語「薬学的に受容可能な」とは、動物における、そしてさらに特にヒトにおける使用のために、連邦規制当局もしくは米国政府により認められたか、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に列挙されたことを意味する。用語「キャリア」とは、治療剤とともに投与される、希釈剤、アジュバンド、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような薬学的なキャリアは、水および油（石油起源、動物起源、植物起源、または合成起源の油（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など）を含む）のような滅菌した液体であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に、好ましいキャリアである。生理食塩水溶液、ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液はまた、特に注射可能な溶液のために、液体キャリアとして使用され得る。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、イネ、フラワー、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、滑石、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物はまた、所望されるならば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含み得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出処方物などの形態を取り得る。この組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドのようなキャリアとともに、坐剤として処方され得る。経口処方物は、薬学的等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準キャリアを含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。このような組成物は、治療有効量の化合物を、好ましくは精製された形態で、適切な量のキャリアとともに含んで、患者への適切な投与のための形態を提供する。処方物は、投与形態に適すべきである。

【0289】

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

【0290】

本発明の化合物は、中性のまたは塩の形態として処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもののようなアニオンとともに形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののようなカチオンとともに形成される塩が挙げられる。

【0291】

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

【0292】

抗体に関して、患者に投与される投薬量は、代表的に、患者の体重1kgあた

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

【0293】

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

【0294】

（診断および画像化）

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

【0295】

本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供し、このアッセイは、（a）目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞また

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

【0296】

本発明の抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイし得る(例えば、Jalkanenら、J. Cell. Biol. 101:976-985(1985); Jalkanenら、J. Cell. Biol. 105:3087-3096(1987)を参照のこと)。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ(例えば、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)および放射免疫測定法(RIA))が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識(例えば、グルコースオキシダーゼ);放射性同位体(例えば、ヨウ素(125I、121I)、炭素(14C)、硫黄(35S)、トリチウム(3H)、インジウム(112In)、およびテクネチウム(99Tc));発光標識(例えば、ルミノール);ならびに蛍光標識(例えば、フルオレセインおよびローダミン)、ならびにビオチンが挙げられる。

【0297】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおける、目的のポリペプチドの異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。1つの実施形態において、診断は、a)目的のポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識化分子を被験体に(例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に)投与する工程;b)このポリペプチドが発現する被験体内

の部位でこの標識化分子が優先的に濃縮することを可能にするために（および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために）投与後、時間間隔を待つ工程；c）バックグラウンドレベルを決定する工程；およびd）この被験体中の標識化分子を検出する工程、を包含し、その結果、このバックグラウンドレベルを越える標識化分子の検出は、この被験体が目的のポリペプチドの異常な発現と関連する特定の疾患または障害を有することを示す。バックグラウンドレベルは、特定の系について以前に決定された標準的な値と、検出された標識化分子の量を比較する工程を包含する種々の方法により決定され得る。

【0298】

被験体の大きさおよび使用される画像化システムが、診断の画像を作製するために必要である画像化部分の量を決定するということは、当該分野において理解される。放射性同位体部分の場合、ヒト被験体について、注入される放射能の量は、通常、約5～20mキュリーの範囲の99mTcである。次いで、標識化抗体または標識化抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置で優先的に蓄積する。インビボでの腫瘍の画像化は、S.W. Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments」(Tumor Imaging、第13章：The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. BurchielおよびB.A. Rhodes編、Masson Publishing Inc. (1982)において、記載される。

【0299】

使用する標識の型および投与の様式を含む、いくつかの変動に依存して、標識化分子が被験体中の部位に優先的に濃縮することを可能にするため、および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるための投与後の時間間隔は、6～48時間または6～24時間または6～12時間である。別の実施形態において、投与後の時間間隔は、5～20日間または5～10日間である。

【0300】

1つの実施形態において、疾患または障害をモニターすることは、疾患または障害 (d i s e a s e) を診断するための方法を繰り返すことによって実施される (例えば、最初の診断から1ヶ月後、最初の診断から6ヶ月後、最初の診断から1年後、など)。

【0301】

標識化分子の存在は、インビボスキャンニングについての当該分野で公知の方法を使用して患者中で検出され得る。これらの方法は、使用される標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を決定するための適切な方法を決定することができる。本発明の診断方法において使用され得る方法およびデバイスは、コンピュータ連動断層撮影法 (C T)、体全体のスキャン (例えば、陽子 (p o s i t i o n) 放射断層撮影法 (P E T))、磁気共鳴画像法 (M R I)、および超音波診断法を含むが、これらに限定されない。

【0302】

特定の実施形態において、分子を放射性同位体で標識し、そして放射応答外科的機器 (r a d i a t i o n r e s p o n s i v e s u r g i c a l i n s t r u m e n t) (T h u r s t o n ら、米国特許第5,441,050号) を使用して患者中で検出する。別の実施形態において、分子を蛍光化合物で標識し、そして蛍光応答スキャンニング機器を使用して患者中で検出する。別の実施形態において、分子を陽電子射出金属で標識し、そして陽電子射出断層撮影法を使用して患者中で検出する。さらに別の実施形態において、分子を常磁性標識で標識し、そして磁気共鳴画像法 (M R I) を使用して患者中で検出する。

【0303】

(キット)

本発明は、上記の方法において使用され得るキットを提供する。1つの実施形態において、キットは、1つ以上の容器において、本発明の抗体、好ましくは精製した抗体を備える。特定の実施形態において、本発明のキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチドを備える。このエピトープは、キット中に含まれる抗体と特異的に免疫反応する。好ましくは、本発明のキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体をさらに備える。別の特定の実施

形態において、本発明のキットは、目的のポリペプチドへの抗体の結合を検出するための手段を備える（例えば、この抗体は、検出可能な基質（例えば、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物もしくは発光化合物）に結合体化され得るか、または一次抗体を認識する二次抗体が、検出可能な基質と結合体化され得る）。

【0304】

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

【0305】

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

【0306】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清のスクリーニングにおいて使用するための、診断キットを含む。この診断キットは、ポリペプチド抗原またはポリヌクレオチド抗原と特異的に免疫反応する実質的に単離された抗体、およびこの抗体へのこのポリヌクレオチド抗原またはポリペプチド抗原の結合を検出するための手段を備える。1つの実施形態において、抗体は、固体支持体に付着される。特定の実施形態において、抗体は、モノク

ロナル抗体であり得る。キットのこの検出手段は、二次標識化モノクロナール抗体を含み得る。あるいは、またはさらに、この検出手段は、標識化競合抗原を含み得る。

【0307】

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

【0308】

上記のアッセイにおける固体表面試薬は、タンパク質材料を固体支持体材料 (例えば、高分子ビーズ、計深棒、96ウェルプレートまたは濾過材料) に付着させるための公知の技術により調製される。これらの付着方法としては、一般的に、支持体へのタンパク質の非特異的な吸着または固体支持体上の化学的に活性な基 (例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、またはアルデヒド基) とのタンパク質の共有結合 (covalent attachment) (代表的には、遊離アミン基を介する) が挙げられる。あるいは、ストレプトアビジンでコートされたプレートが、ビオチン化された抗原と共に使用され得る。

【0309】

従って、本発明は、この診断方法を行うためのアッセイ系またはキットを提供する。このキットは、一般的に、表面結合された組換え抗原を有する支持体、および表面結合された抗抗原抗体を検出するための、レポーター標識された抗ヒト抗体を備える。

【0310】

(ポリヌクレオチドの使用)

本明細書中で同定された各々のポリヌクレオチドは、試薬として多数の方法において使用され得る。以下の説明は例示的であるとみなされるべきであり、そして公知の技術を利用する。

【0311】

本発明のポリヌクレオチドは、染色体同定のために有用である。実際の配列データ（反復多型性）に基づく染色体マーキング試薬は現在ほとんど利用可能ではないため、新しい染色体マーカーを同定する必要性が存在するままである。各々の配列は、個々のヒト染色体上の特定の位置に特に標的化され、そしてこの位置にハイブリダイズされ得る。従って、本発明の各々のポリヌクレオチドは、当該分野で公知の技術を用いて染色体マーカーとして慣用的に使用され得る。

【0312】

簡単に言うと、配列は、配列番号Xで示される配列またはそれに対する相補体からPCRプライマー（好ましくは、少なくとも15bp（例えば、15～25bp））を調製することによって染色体にマッピングされ得る。プライマーが、ゲノムDNA中の1つより多くの予測されたエクソンにまたがらないように、プライマーは、コンピューター分析を使用して必要に応じて選択され得る。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使用される。配列番号Xに対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみが、増幅されたフラグメントを産生する。

【0313】

同様に、体細胞ハイブリッドは、特定の染色体に対してポリヌクレオチドをPCRマッピングする迅速な方法を提供する。単一のサーマルサイクラーを使用して1日あたり3つ以上のクローンが割り当てられ得る。さらに、ポリヌクレオチドの下位位置決定（sublocalization）は、特定の染色体フラグメントのパネルを用いて達成され得る。使用され得る他の遺伝子マッピング戦略は、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フローソート（labeled flow sorted）染色体でのプレスクリーニング、染色体特異的cDNAライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択、およびコンピューターマッピング技術（例えば、その全体が本明細書中に参考として

援用される、Shuler, Trends Biotechnol 16:456-459 (1998)を参照のこと)を含む。

【0314】

ポリヌクレオチドの正確な染色体位置はまた、中期染色体スプレッド(spread)の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)を使用して獲得され得る。この技術は500または600塩基ほどの長さのポリヌクレオチドを使用する；しかし2,000~4,000bpのポリヌクレオチドが好ましい。この技術の総説に関しては、Vermaら、「Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques」, Pergamon Press, New York (1988)を参照のこと。

【0315】

染色体マッピングについては、ポリヌクレオチドは、個々に(単一染色体またはその染色体上の単一部分をマークするために)またはパネルで(複数部位および/または複数染色体をマークするために)使用され得る。

【0316】

従って、本発明はまた、染色体の位置決定のための方法も提供し、この方法は、(a)表1におけるポリヌクレオチド配列および配列番号XからPCRプライマーを調製する工程、ならびに(b)個々の染色体を含む体細胞ハイブリッドをスクリーニングする工程を包含する。

【0317】

本発明のポリヌクレオチドは、同様に、放射線ハイブリッドマッピング、HAPPYマッピング、および長範囲制限マッピングに有用である。これらの技術および当該分野で公知の他の技術の概説について、例えば、Dear「Genome Mapping: A Practical Approach」IRL Press at Oxford University Press, London (1997); Aydin, J. Mol. Med. 77:691~694 (1999); Haciaら、Mol. Psychiatry 3:483~492 (1998); Herrickら、Chromosome Res. 7:409~423 (1999); Hamiltonら、Methods Cell B

iol. 62: 265~280 (2000); および/または Ott, J. Hered. 90: 68~70 (1999) (これらの各々は、その全体が参考として本明細書中に援用される) を参照のこと。

【0318】

一旦、ポリヌクレオチドが正確な染色体位置にマップされると、ポリヌクレオチドの物理的位置は、連鎖分析において使用され得る。連鎖分析は、染色体位置と特定の疾患の提示との間の同時遺伝 (coinheritance) を確立する。(疾患マッピングデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Library を通してオンラインで利用可能である) において見いだされる)。1メガベースマッピング解像度および20kbあたり1遺伝子と仮定すると、疾患と関連する染色体領域に正確に位置決定されるcDNAは、50~500の潜在的な原因遺伝子のうちの1つであり得る。

【0319】

従って、一旦、同時遺伝が確立されると、罹患個体と非罹患個体との間での本発明のポリヌクレオチドおよび対応する遺伝子における差異が試験され得る。まず、染色体中の可視的構造変化(例えば、欠失または転座)は染色体スプレッドにおいて、またはPCRによって試験される。構造的変化が存在しない場合、点変異の存在が確認される。何人かのまたは全ての罹患個体で観察されたが、正常な個体では観察されなかった変異は、この変異がこの疾患を引き起こし得ることを示す。しかし、いくつかの正常な個体由来のポリペプチドおよび対応する遺伝子の完全な配列決定は、変異を多型性と区別するために要求される。新しい多型性が同定される場合、この多型ポリペプチドはさらなる連鎖分析のために使用され得る。

【0320】

さらに、非罹患個体と比較した、罹患個体の遺伝子の増加または減少した発現が、本発明のポリヌクレオチドを使用して評価され得る。任意のこれらの変化(変化した発現、染色体再配置、または変異)は、診断マーカーまたは予後マーカー

ーとして使用され得る。

【0321】

従って、本発明はまた、障害の診断の間に有用な診断方法を提供し、この方法は、個体由来の細胞または体液中の本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、および測定された遺伝子発現レベルを標準のポリヌクレオチド発現レベルと比較する工程を包含し、これによって、標準と比較して、遺伝子発現レベルの増加または減少が、障害の指標になる。

【0322】

なお別の実施形態では、本発明は、サンプルを、試験被験体に由来する増殖性および/またはガン性のポリヌクレオチドの存在について分析するためのキットを含む。一般的実施形態において、このキットは、本発明のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む少なくとも1つのポリヌクレオチドプローブ、および適切な容器を備える。この特定の実施形態では、このキットは、本発明のポリヌクレオチドの内部領域を規定する2つのポリヌクレオチドプローブを含み、ここで各プローブは、この領域に対して内部に31'マー末端を含む1つの鎖を有する。さらなる実施形態では、このプローブは、ポリメラーゼ連鎖反応増幅のためのプライマーとして有用であり得る。

【0323】

例えば、腫瘍の診断を含む、関連障害の診断が既に従来方法によって行われている場合、本発明は、予後インジケータとして有用であり、それによって増強または抑制された本発明のポリヌクレオチドの発現を示す患者が、標準レベルにより近いレベルでこの遺伝子を発現する患者と比較して悪い臨床結果を経験する。

【0324】

「本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する(こと)」によって、本発明のポリペプチドのレベルまたは本発明のポリペプチドをコードするmRNAのレベルを、第1の生物学的サンプルにおいて直接的(例えば、絶対のタンパク質レベルまたはmRNAレベルを決定または評価することによって)または相対的(例えば、第2の生物学的サンプル中のポリペプチドレベルまたはmRNAレ

ベルに対して比較することによって)のいずれかで定性的または定量的に測定または評価することが意図される。好ましくは、第1の生物学的サンプル中のポリペプチドレベルまたはmRNAレベルが測定または評価され、そして標準のポリペプチドレベルまたはmRNAレベルに対して比較され、この標準は、関連障害を有さない個体から得られる第2の生物学的サンプルから得られるかまたは関連障害を有さない個体の集団由来のレベルを平均することによって決定される。当該分野で認識されるように、一旦標準的なポリペプチドレベルまたはmRNAレベルが公知になれば、これを、比較のための標準として反復して用い得る。

【0325】

「生物学的サンプル」によって、本発明のポリペプチドまたは対応するmRNAを含む、個体、体液、細胞株、組織培養物または他の供給源から得られる任意の生物学的サンプルが意図される。示されるように、生物学的サンプルは、本発明のポリペプチドを含む体液(例えば、精液、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液)、および本発明のポリペプチドを発現することが見出された組織供給源を含む。哺乳動物から組織生検および体液を得るための方法は、当該分野で周知である。生物学的サンプルがmRNAを含む場合、組織生検が好ましい供給源である。

【0326】

上記で提供された方法は好ましくは、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドが固体支持体に結合される、診断方法および/またはキットに適用され得る。1つの例示的な方法では、この支持体は、米国特許第5,837,832号、同第5,874,219号および同第5,856,174号に記載される、「遺伝子チップ」または「生物学的チップ」であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドが結合されたこのような遺伝子チップを用いて、本発明のポリヌクレオチド配列と、試験被験体から単離されたポリヌクレオチドとの間の多型性を同定し得る。このような多型の知識(すなわち、その多型の位置、およびその多型の存在)は、多くの障害(例えば、神経障害、免疫系障害、筋肉障害、生殖障害、胃腸障害、肺障害、心血管障害、腎障害、増殖性障害、ならびに/または癌性疾患および癌性状態)について、疾患遺伝子座を同定する際に有益であ

る。このような方法は、米国特許第5,858,659号および同第5,856,104号に記載される。上記に参照した米国特許は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0327】

本発明は、化学的に合成されたか、もしくはペプチド核酸(PNA)として再現されたか、または当該分野で公知の他の方法に従って、本発明のポリヌクレオチドを包含する。PNAの使用は、本発明のポリヌクレオチドが固体支持体上、または、遺伝子チップ上へ組み込まれる場合、好ましい形態として役立つ。本発明の目的のために、ペプチド核酸(PNA)は、ポリアミド型のDNAアナログであり、そしてアデニン、グアニン、チミンおよびシトシンについてのモノマー単位が市販されている(Perceptive Biosystems)。DNAの特定の成分(例えば、リン、酸化リンまたはデオキシリボース誘導体)は、PNA中に存在しない。P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.BergおよびO.Buchardt, Science 254, 1497(1991); ならびにM.Egholm, O.Buchardt, L.Christensen, C.Behrens, S.M.Freier, D.A.Driver, R.H.Berg, S.K.Kim, B.NordenおよびP.E.Nielsen, Nature 365, 666(1993)によって開示されるように、PNAは、相補的なDNA鎖に対して特異的かつ緊密に結合し、そしてヌクレアーゼによって分解されない。実際、PNAは、DNA自体が結合するよりも強力にDNAに結合する。これはおそらく、2つの鎖の間に静電斥力が存在せず、そしてまたポリアミド骨格がより可撓性が高いことによる。これに起因して、PNA/DNA二重鎖は、DNA/DNA二重鎖よりも広範囲のストリンジエンシー条件下で結合し、多重鎖ハイブリダイゼーションを行うのをより容易にする。強力な結合に起因して、DNAを用いるよりも小さいプローブが用いられ得る。さらに、おそらく、単一の塩基ミスマッチが、PNA/DNAハイブリダイゼーションを用いて決定され得る。なぜなら、PNA/DNAの15マーにおける単一のミスマッチは、DNA/DNAの15マー二重鎖については4~16であるのに対して、融点($T_{sub.m}$)を8~20 低下させるからで

ある。また、PNA中に電荷基が存在しないことは、ハイブリダイゼーションが、低いイオン強度で行われ得、そして分析の間の塩によって可能な妨害を減少させることを意味する。

【0328】

本発明は、哺乳動物におけるガンの検出を含むがこれらに限定されない用途を有する。特に、本発明は、以下を含むがこれらに限定されない、病理学的細胞増殖新形成の診断の間に有用である：急性骨髄性白血病（急性単球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性赤白血病、急性巨核球性白血病、および急性未分化白血病などを含む）；および慢性骨髄性白血病（慢性骨髄単球性白血病、慢性顆粒球性白血病などを含む）。好ましい哺乳動物としては、有尾猿（monkey）、無尾猿（ape）、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギおよびヒトが挙げられる。特に好ましいのは、ヒトである。

【0329】

病理学的細胞増殖障害はしばしば、原癌遺伝子の不適切な活性化に関連する（Gelmann, E. P. ら, 「The Etiology of Acute Leukemia: Molecular Genetics and Viral Oncology」, Neoplastic Diseases of the Blood, 第1巻, Wiernik, P. H. ら編, 161-182 (1985)）。新形成は現在、ウイルス配列の染色体への挿入、より活性に転写される領域への遺伝子の染色体転座、または何らかの他の機構による、正常な細胞遺伝子産物の定性的変化から、または遺伝子発現の定量的改変から生じると考えられている（Gelmann ら、前出）。特定の遺伝子の変異または変更された発現が、他の組織および他の細胞型の中でも、いくつかの白血病の病因と関連するようである（Gelmann ら、前出）。実際、いくつかの動物新形成に関連する癌遺伝子のヒト対応物は、ヒトの白血病および癌のいくつかの症例において増幅または転座されている（Gelmann ら、前出）。

【0330】

例えば、c - myc 発現は、非リンパ球性白血病細胞株 HL - 60 において高

度に増幅される。HL-60細胞が増幅を止めるように化学的に誘導される場合、c-mycのレベルは、ダウンレギュレートされることが見出される(国際公開番号WO91/15580)。しかし、c-mycまたはc-mybの5'末端に相補的であるDNA構築物へのHL-60細胞の暴露が、c-mycタンパク質またはc-mybタンパク質の発現をダウンレギュレートする対応するmRNAの翻訳をブロックし、処理した細胞の細胞増殖および分化の停止を引き起こすことが示されている(国際公開番号WO91/15580; Wickstromら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85:1028(1988); Anfossiら、Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3379(1989))。しかし、当業者は、増殖表現型を示すことが公知である種々の起源の多数の細胞および細胞型を考慮すれば、本発明の有用性が造血性の細胞および組織の増殖性障害の処置に限定されないことを認識する。

【0331】

前記に加えて、本発明のポリヌクレオチドは、三重らせん形成を介して、またはアンチセンスDNAもしくはRNAを介して遺伝子発現を制御するために使用され得る。アンチセンス技術は、例えば、Okano, J. Neurochem. 56:560(1991); 「Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression」, CRC Press, Boca Raton, FL(1988)において考察される。三重らせん形成は例えば、Leeら、Nucleic Acids Research 6:3073(1979); Cooneyら、Science 241:456(1988); およびDervanら、Science 251:1360(1991)において考察される。両方の方法は、相補的DNAまたは相補的RNAへのポリヌクレオチドの結合に依存する。これらの技術に関して、好ましいポリヌクレオチドは通常、20~40塩基長のオリゴヌクレオチドであり、そして転写に關与する遺伝子領域(三重らせん - Leeら、Nucl. Acids Res. 6:3073(1979); Cooneyら、Science 241:456(1988); およびDervanら、Science 251:1360(1991)を参照のこと)またはmRNA

自体 (アンチセンス - Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)) のいずれかに相補的である。三重らせん形成は、最適にはDNAからのRNA転写の遮断を生じるが、アンチセンスRNAハイブリダイゼーションは、ポリペプチドへのmRNA分子の翻訳を阻止する。上記に記載のオリゴヌクレオチドはまた、アンチセンスRNAまたはDNAが、インビボで発現されて本発明の抗原のポリペプチド産生を阻害し得るように細胞に送達され得る。両方の技術は、モデル系において効果的であり、そして本明細書に開示される情報は、疾患を処置するための試みにおいて、特に、増殖性疾患および/または状態の処置のために、アンチセンスまたは三重らせんポリヌクレオチドを設計するために使用され得る。

【0332】

本発明のポリヌクレオチドはまた、遺伝子治療において有用である。遺伝子治療の1つの目標は、遺伝欠損を修正する試みにおいて、欠損遺伝子を有する生物へ正常遺伝子を挿入することである。本発明に開示されるポリヌクレオチドは、高度に正確な様式でこのような遺伝欠損を標的とする手段を提供する。別の目標は、宿主ゲノム中には存在しなかった新しい遺伝子を挿入し、それによって宿主細胞中に新しい形質を生成することである。

【0333】

ポリヌクレオチドはまた、微小な生物学的サンプルから個体を同定するために有用である。例えば、米国軍は、その職員を同定するために制限フラグメント長の多型性 (RFLP) の使用を考慮している。この技術において、個体のゲノムDNAは1つ以上の制限酵素で消化され、そして職員を同定するため固有なバンドを生じるためのサザンプロットについてプロービングされる。この方法は、「認識票 (Dog tag)」 (これは、失われたり、交換されたり、または盗まれたりすることにより、ポジティブな同定を困難にし得る) の現在の限界を受けない。本発明のポリヌクレオチドは、RFLPのためのさらなるDNAマーカーとして使用され得る。

【0334】

本発明のポリヌクレオチドはまた、個体のゲノムの選択された部分の実際の塩基ごとのDNA配列を決定することによって、RFLPに対する代替物として使用され得る。これらの配列は、このような選択されたDNAを増幅しそして単離するためにPCRプライマーを調製するために使用され得、次いで、この選択されたDNAは、配列決定され得る。各個体が固有のセットのDNA配列を有するので、この技術を使用して、個体が同定され得る。一旦、固有のIDデータベースが個体について確立されると、その個体が生存していようとまたは死亡していようと、その個体のポジティブ同定が、極めて小さな組織サンプルからなされ得る。

【0335】

法医学生物学もまた、本明細書に開示されるようなDNAに基づく同定技術を使用して利益を得る。組織（例えば、髪または皮膚）、または体液（例えば、血液、唾液、精液、滑液、羊水、乳汁、リンパ、肺痰（pulmonary sputum）またはサーファクタント、尿、糞便物質など）のような非常に小さな生物学的サンプルから得られたDNA配列は、PCRを使用して増幅され得る。ある先行技術において、DQaクラスII HLA遺伝子のような多型性遺伝子座から増幅された遺伝子配列は、個体を同定するための法医学生物学において使用される。（Erllich, H., PCR Technology, Freeman and Co. (1992)）。一旦、これらの特異的多型性遺伝子座が増幅されると、これらは1つ以上の制限酵素で消化され、これは、DQaクラスII HLA遺伝子に対応するDNAでプロービングされたサザンブロットについてのバンドの同定セットを生じる。同様に、本発明のポリヌクレオチドは、法医学的目的のための多型性マーカーとして使用され得る。

【0336】

また、特定の組織の供給源を同定し得る試薬についての必要性が存在する。例えば、未知の起源の組織が提供される場合、法医学においてこのような必要性が生じる。適切な試薬は、例えば、本発明の配列から調製される、DNAプローブまたはプライマーを含み得る。このような試薬のパネルは、種および/または器

官型によって組織を同定し得る。同様の様式で、これらの試薬は、夾雑物について組織培養物をスクリーニングするために使用され得る。

【0337】

本発明のポリヌクレオチドはまた、生物学的サンプル中に存在する組織または細胞型の示差的同定のためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。同様に、本発明のポリペプチドに関するポリペプチドおよび抗体は、組織（例えば、免疫組織化学アッセイ）または細胞型（例えば、免疫細胞学アッセイ）の示差的同定のための免疫学的プローブを提供するのに有用である。さらに、「標準」遺伝子発現レベル（すなわち、障害を有しない個体由来の健康組織の発現レベル）と比較して、上記の組織または細胞の多くの障害に対して、本発明のポリヌクレオチド/ポリペプチドの有意に高いかまたは低いレベルの遺伝子発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織（例えば、本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドを発現する組織、および/または癌性組織および/または創傷組織）または体液（例えば、漿液、血漿、尿、滑液または髄液）において検出され得る。

【0338】

従って、本発明は、以下の工程を含む障害の診断方法を提供する：（a）個体の細胞または体液中の遺伝子発現レベルをアッセイする工程；（b）標準的な遺伝子発現レベルと、この遺伝子発現レベルを比較し、それにより、標準の発現レベルと比較して、アッセイされた遺伝子発現レベルの増加または減少が障害を示す、工程。

【0339】

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

【0340】

(ポリペプチドの使用)

本明細書中で同定される各々のポリペプチドは、多くの方法において使用され得る。以下の記述は、例示として考慮されるべきであり、そして公知の技術を利用する。

【0341】

本発明のポリペプチドに対して指向されるポリペプチドおよび抗体は、組織（例えば、ABC免疫ペルオキシダーゼのような免疫組織化学アッセイ（Hsuら、*J. Histochem. Cytochem.* 29:577-580 (1981)）または細胞型（例えば、免疫細胞化学アッセイ）の差次的同定のための免疫学的プローブを提供するために有用である。

【0342】

抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いて、生物学的サンプル中の本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのレベルをアッセイし得る（例えば、Jalkanenら、*J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985)；Jalkanenら、*J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987)を参照のこと）。タンパク質の遺伝子発現を検出するのに有用な、他の抗体に基づく方法には、免疫学的検定（例えば、酵素結合免疫吸着検定（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA））が含まれる。適切な抗体アッセイの標識は、当該分野で公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）；放射性同位体（例えば、ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、およびテクネチウム（ ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru ）；発光標識（例えば、ルミノール）；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）ならびにビオチンが挙げられる。

【0343】

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

【0344】

放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、およびテクネチウム（ ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru ）、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴により検出可能な材料のような適切な検出可能な画像化部分で標識された、タンパク質特異的抗体または抗体フラグメントは、免疫系の障害について検査されるべき哺乳動物に（例えば、非経口的、皮下、または腹腔内に）導入される。被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の約5～20ミリキュリーの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを発現する細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、S.W. Burchielら、「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their F

ragments」(Tumor Imagingの第13章:The Radiochemical Detection of Cancer、S.W.BurchielおよびB.A.Rhodes編、Masson Publishing Inc.(1982))に記載される。

【0345】

1つの実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合する本発明のポリペプチド(例えば、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドおよび/または抗体)を投与することによる、本発明の組成物の細胞への特異的な送達のための方法を提供する。1つの例において、本発明は、治療タンパク質を標的化細胞中へ送達するための方法を提供する。別の例において、本発明は、一本鎖核酸(例えば、アンチセンスまたはリボザイム)または二本鎖核酸(例えば、細胞のゲノムに組み込み得るか、またはエピソームにて複製し得、そして転写され得るDNA)を、標的化細胞に送達するための方法を提供する。

【0346】

別の実施形態において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグに関連する本発明のポリペプチドを投与することによる細胞の特異的な破壊(例えば、腫瘍細胞の破壊)のための方法を提供する。

【0347】

「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクタ系、放射性同位体、ホロ毒素(holotoxin)、改変型毒素、毒素の触媒サブユニット、または規定の条件下で細胞死を引き起こす細胞中もしくは細胞表面には通常存在しない任意の分子もしくは酵素を結合および活性化する1つ以上の化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:当該分野で公知の放射性同位体、固有のまたは誘導された内因性の細胞傷害性エフェクタ系に結合する化合物(例えば、抗体(またはその補体固定含有部分))、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNAse、毒素、リシン、アプリン、Pseudomonas外毒素A、ジフテリア毒素、サポリン、モモルジン(momordin)、ゲロニン(gelonin)、ヤマゴボウ抗

ウイルスタンパク質、サルシン (sarcin) およびコレラ毒素。「毒素」はまた、細胞分裂停止剤もしくは細胞破壊剤、治療薬または放射活性金属イオン (例えば、 ^{213}Bi)) もしくは他の放射性同位体 (例えば、 ^{103}Pd 、 ^{133}Xe 、 ^{131}I 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{153}Sm 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、 $^{90}\text{イットリウム}$ 、 $^{117}\text{スズ}$ 、 $^{186}\text{レニウム}$ 、 $^{166}\text{ホルミウム}$ 、および $^{188}\text{レニウム}$) ; 発光標識 (例えば、ルミノール) ; および蛍光標識 (例えば、フルオレセインおよびローダミン) 、ならびにビオチンを含む。

【0348】

当該分野において公知の技術は、本発明のポリペプチド (抗体を含む) を標識化するために適用され得る。このような技術としては、二官能性結合剤の使用 (例えば、米国特許第5,756,065号; 同第5,714,631号; 同第5,696,239号; 同第5,652,361号; 同第5,505,931号; 同第5,489,425号; 同第5,435,990号; 同第5,428,139号; 同第5,342,604号; 同第5,274,119号; 同第4,994,560号; および同第5,808,003号を参照のこと; これら各々の内容は、本明細書中に参考としてその全体を援用する) が挙げられるが、これに限定されない。

【0349】

従って、本発明は、障害の診断方法を提供し、これは以下を含む: (a) 個体の細胞または体液における本発明のポリペプチドの発現レベルをアッセイする工程; および (b) アッセイされたポリペプチドの発現レベルを標準のポリペプチドの発現レベルと比較し、それによって標準の発現レベルと比較してアッセイされたポリペプチドの発現レベルにおける増加または減少が障害を示す工程。癌に関しては、個体由来の生検された組織中の相対的に高い量の転写物の存在は、疾患の発症の素因を示し得るか、または実際の臨床的な症状が明らかとなる前に疾患を検出するための手段を提供し得る。より決定的なこのタイプの診断は、保健専門家がより早く予防策または積極的な処置を使用し、それによって癌の発症またはさらなる進行を防ぐことを可能にし得る。

【0350】

さらに、本発明のポリペプチドを用いて疾患または状態（例えば、神経障害、免疫系障害、筋肉障害、生殖障害、胃腸障害、肺障害、心血管障害、腎臓障害、増殖障害ならびに／または癌性疾患および状態など）を処置または予防し得る。例えば、患者は、ポリペプチドの非存在またはレベルの減少を元に戻すこと（例えば、インスリン）、異なるポリペプチドの不在またはレベルの減少を補充すること（例えば、ヘモグロビンBに対するヘモグロビンS、SOD、カタラーゼ、DNA修復タンパク質）、ポリペプチドの活性を阻害すること（例えば、癌遺伝子または腫瘍抑制因子）、ポリペプチドの活性を活性化すること（例えば、レセプターに結合させることによって）、遊離リガンドについて膜結合レセプターと競合させることによって膜結合レセプターの活性を減少させること（例えば、炎症を低減させる際に用いられる可溶性TNFレセプター）、または所望の応答をもたらすこと（例えば、血管の成長の阻害、増殖細胞または組織に対する免疫応答の増強）の試みにおいて、本発明のポリペプチドが投与され得る。

【0351】

同様に、本発明のポリペプチドに対して指向される抗体もまた用いられ、疾患（上記、および本明細書中のどこかに記載されるような）を処置し得る。例えば、本発明のポリペプチドに対して指向される抗体の投与には、ポリペプチドを結合して、そして／またはポリペプチドを中和し、そして／またはポリペプチドの過剰産生を低減し得る。同様に、抗体の投与は、例えば、膜に結合したポリペプチド（レセプター）へ結合することにより、ポリペプチドを活性化し得る。

【0352】

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

【0353】

(遺伝子治療方法)

本発明の別の局面は、障害、疾患および状態を処置または予防するための遺伝子治療方法である。この遺伝子治療方法は、本発明のポリペプチドの発現を達成するための、核酸 (DNA、RNA およびアンチセンス DNA または RNA) 配列の動物への導入に関する。この方法は、標的組織によるこのポリペプチドの発現のために必要なプロモータおよび他の任意の遺伝因子と、作動可能に連結した本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを必要とする。このような遺伝子治療および送達技術は当該分野において公知である (例えば、本明細書中に参考として援用される、WO90/11092 を参照のこと)。

【 0 3 5 4 】

従って、例えば、患者由来の細胞は、エキソビボで本発明のポリヌクレオチドと作動可能に連結したプロモーターを含むポリヌクレオチド (DNA または RNA) を用いて操作され得、次いで、操作された細胞は、本発明のポリペプチドを用いて処置される患者に提供される。このような方法は、当該分野において周知である。例えば、Belldegrun, A. ら、J. Natl. Cancer Inst. 85:207-216 (1993); Ferrantini, M. ら、Cancer Research 53:1107-1112 (1993); Ferrantini, M. ら、J. Immunology 153:4604-4615 (1994); Kaido, T. ら、Int. J. Cancer 60:221-229 (1995); Ogura, H. ら、Cancer Research 50:5102-5106 (1990); Santodonato, L. ら、Human Gene Therapy 7:1-10 (1996); Santodonato, L. ら、Gene Therapy 4:1246-1255 (1997); および Zhang, J. - F. ら、Cancer Gene Therapy 3:31-38 (1996) (これらは、本明細書中に参考として援用される) を参照のこと。1つの実施形態においては、操作される細胞は、動脈細胞である。この動脈細胞は、動脈、動脈の周囲の組織への直接的な注射を介して、またはカテーテル注入を介して患者に再導入され得る。

【 0 3 5 5 】

以下により詳細に考察されるように、このポリヌクレオチド構築物は、注射可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法（例えば、組織（心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓など）の間質空間への注射）により送達され得る。このポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性のキャリア中で送達され得る。

【0356】

1つの実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドとして送達される。用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAとは、細胞への侵入を補助し、促進し、または容易にするために作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチンまたは沈殿剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、本発明のポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法により調製され得るリポソーム処方物中およびリポフェクチン処方物中などで送達され得る。このような方法は、例えば、米国特許第5,593,972号、同第5,589,466号および同第5,580,859号（これらは、本明細書中に参考として援用される）に記載される。

【0357】

遺伝子治療方法において使用されるポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノム中に組み込まれないかまたは複製を可能にする配列を含まない構築物である。適切なベクターとしては、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG;Pharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL；ならびにInvitrogenから入手可能なpEF1/V5、pcDNA3.1、およびpRc/CMV2が挙げられる。他の適切なベクターは、当業者に容易に明らかである。

【0358】

当業者に公知の任意の強力なプロモーターは、ポリヌクレオチド配列の発現を駆動するために用いられ得る。適切なプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター）；または異種プロ

モーター（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター）；RSウイルス（RSV）プロモーター；誘導性プロモーター（例えば、MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーター）；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ApoAⅠプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター）；レトロウイルスLTR；b-アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。このプロモーターはまた、本発明のポリヌクレオチドについてネイティブなプロモーターであり得る。

【0359】

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

【0360】

ポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する）の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、器官組織の細網線維間の、細胞間の液体ムコ多糖類基質、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞（connective tissue ensheathing muscle cell）内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下で議論される理由のために好ましい。本発明のポリヌクレオチド構築物は、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達され得る。本発明のポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボでの筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発

現する能力において、特に適格である。

【0361】

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

【0362】

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

【0363】

裸のポリヌクレオチドは、送達部位での直接の針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、およびいわゆる「遺伝子銃」を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の方法によって送達される。これらの送達方法は、当該分野で公知である。

【0364】

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

【0365】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド構築物は、リポソーム調製物中で複合体化している。本発明にて使用するためのリポソーム調製物は、カチオン性（正に荷電した）、アニオン性（負に荷電した）および中性の調製物を包含する。しかしながら、カチオン性リポソームとポリアニオン性核酸との間で強固な荷

電複合体を形成し得るので、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、機能的形態において、プラスミドDNA（本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 7413~7416）；mRNA（本明細書中で参考として援用される、Maloneら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 6077~6081）；および精製された転写因子（本明細書中で参考として援用される、Debsら、J. Biol. Chem. (1990) 265: 10189~10192）の細胞内送達を媒介することが示されている。

【0366】

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

【0367】

当該分野で周知の技術を使用して、他のカチオン性リポソームを、容易に入手可能な物質より調製し得る。DOTAP(1, 2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リポソームの合成の記述に関して、例えばPCT公開番号WO90/11092（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。DOTMAリポソームの調製は文献にて説明されており、例えば、本明細書中で参考として援用される、P. Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84: 7413~7417を参照のこと。類似した方法を使用して、他のカチオン性脂質物質よりリポソームを調製し得る。

。

【0368】

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

【0369】

例えば、商業的に、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) を種々の組み合わせにおいて使用して、コレステロールを添加してもしなくても、従来のリポソームを生成し得る。従って、例えば、超音波処理バイアル中への窒素ガス流下で、各 50 mg の DOPG および DOPC を乾燥することにより、DOPG / DOPC ベシクルを調製し得る。このサンプルを一晩真空ポンプ下に置き、そして次の日、脱イオン水で水和する。次いで、バスを、15 EC で循環させながら、最大設定にて、逆位カップ (バス型) プロブを装備した Heat Systems モデル 350 超音波処理器を使用して、栓をしたバイアル中にてこのサンプルを 2 時間超音波処理する。あるいは、負に荷電した小胞を、超音波処理なしで調製して多重膜小胞を生成し得るか、または核孔膜 (nucleopore membrane) を通して押し出すことにより別々の大きさの単膜小胞を生成し得る。他の方法は、当業者に公知でありそして利用可能である。

【0370】

このリポソームとしては、多重膜小胞 (MLV)、小さな単膜小胞 (SUV) または大きな単膜小胞 (LUV) が挙げられ得、SUV が好ましい。当該分野で

周知の方法を使用して、種々のリポソーム - 核酸複合体が調製される。例えば、本明細書中で参考として援用される、Straubingerら、Methods of Immunology (1983)、101:512~527を参照のこと。例えば、核酸を含有するMLVは、ガラスチューブの壁面にリン脂質の薄膜を堆積させ、そしてその後、カプセル化されるべき物質の溶液で水和することによって調製され得る。SUVはMLVの長期超音波処理により調製され、単膜リポソームの均質集団を生成する。封入されるべき物質を、予め形成されたMLVの懸濁液に添加し、次いで、超音波処理する。カチオン性脂質を含むリポソームを使用する場合、乾燥した脂質膜を、滅菌水または10mM Tris / NaClのような等張性緩衝溶液のような適切な溶液中に再懸濁し、超音波処理し、次いで、予め形成されたリポソームをDNAと直接混合する。正に荷電したリポソームのカチオン性DNAへの結合に起因して、リポソームおよびDNAは非常に安定な複合体を形成する。SUVは、小核酸フラグメントを用いての用途を見出す。LUVは、当該分野で周知の多くの方法により調製される。一般に使用される方法としては、Ca²⁺ - EDTAキレート化 (Papahadjopoulosら、Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilsonら、Cell (1979) 17:77; エーテル注入 (Deamer, D. およびBangham, A., Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostroら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348); 界面活性剤透析 (Enoch, H. およびStrittmatter, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:145); および逆相エバポレーション (REV) (Fraleyら、J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka, F. およびPapahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; Schaefer-Ridderら、Science (1982) 215:166) が挙げられ、これらの文献は本明細書中で参考として援用される。

【0371】

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

【0372】

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

【0373】

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

【0374】

このレトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。トランスフェクトされ得るパッ

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

【0375】

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

【0376】

特定の他の実施形態において、アデノウイルスベクター中に含まれるポリヌクレオチドを用いて、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。アデノウイルスは、それが本発明のポリペプチドをコードし、そして発現し、それと同時に通常の溶菌性ウイルス生活環にて複製するその能力に関して不活性化されるように操作され得る。アデノウイルス発現は、そのウイルスDNAの宿主細胞染色体への組み込み無しに達成され、その結果、挿入性変異誘発についての心配が軽減される。さらに、アデノウイルスは、何年もの間、腸の生ワクチンとして優れた安全側面を伴って使用されている(Schwartz et al., A.R. (1974)、Am.Rev.Respir.Dis., 109:233-238)。最終的に、アデノウイルス媒介性遺伝子移入が、コトンラットの肺への-1-アンチトリプシンおよびCFTRの移入を含む多くの例において実証されている(R

osenfeld, M. A. ら (1991)、Science、252:431~434; Rosenfeld ら (1992)、Cell、68:143~155)。さらに、ヒト癌における原因物質としてアデノウイルスを確立しようとする広範な研究は、一様に否定的であった (Green, M. ら (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:6606)。

【0377】

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

【0378】

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

【0379】

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

【0380】

例えば、本発明において使用するために適切なAAVベクターは、DNA複製、キャプシド形成、および宿主細胞組み込みに必要な配列すべてを含む。Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press(1989)において見いだされる方法のような、標準的クローニング方法を使用して、ポリヌクレオチド構築物を、このAAVベクターに挿入する。次いで、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む、任意の標準的技術を使用して、この組換えAAVベクターを、ヘルパーウイルスに感染しているパッケージング細胞にトランスフェクトする。適切なヘルパーウイルスとしては、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、ワクシニアウイルス、またはヘルペスウイルスが挙げられる。一旦パッケージング細胞がトランスフェクトおよび感染されると、それらはそのポリヌクレオチド構築物を含む感染性AAVウイルス粒子を生成する。次いで、エキソビボまたはインビボのいずれかで、これらのウイルス粒子を使用して真核生物細胞を形質導入する。この形質導入細胞は、そのゲノムに組み込まれたポリヌクレオチド構築物を含み、そして本発明のポリペプチドを発現する。

【0381】

遺伝子治療の別の方法は、相同組換え（例えば、米国特許第5,641,670号、1997年6月24日発行；国際公開第WO96/29411号、1996年9月26日公開；国際公開第WO94/12650号、1994年8月4日公開；Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932~8935(1989)；およびZijlstraら、Nature 342:435~438(1989)を参照のこと）を介して、異種制御領域および内在性ポリヌクレオチド配列（例えば、本発明のポリペプチドをコードしている配列）を作動可能に連結する工程を含む。この方法は、標的細胞中に存在しているが、通常はその細胞中で発現しないかまたは所望するよりも低いレベルで発現する、遺伝子の活性化を含む。

【0382】

当該分野で既知の標準的技術を使用して、ポリヌクレオチド構築物を作製する。この構築物は、プロモーターを、そのプロモーターに隣接した標的化配列とともに含む。適切なプロモーターが、本明細書中に記載されている。標的化配列は、プロモーター - 標的化配列と内在性配列との相同組換えを可能にするに十分にその内在性配列に対して相補的である。標的化配列は、所望される内在性ポリヌクレオチド配列の5'末端の十分近くに存在し、それゆえ、相同組換えに際して、そのプロモーターは、その内在性配列に作動可能に連結される。

【0383】

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

【0384】

裸のポリヌクレオチドとしてか、もしくは上記により詳細に記載されるようなリポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、ウイルス全体、リポフェクション、

沈殿剤などのようなトランスフェクション促進剤と一緒にかのいずれかで、このプロモーター - 標的化配列構築物を細胞に送達する。直接針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、粒子加速器などを含む任意の方法により、Pプロモーター - 標的化配列を送達し得る。この方法を、下記により詳細に記載する。

【0385】

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

【0386】

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

【0387】

その投与形態によって、治療効果を提供するのに十分な量にて1つ以上の分子が発現される限り、上記のポリヌクレオチド構築物のうちのいずれかの任意の投与形態が使用され得る。これは、直接針注射、全身性注射、カテーテル注入、バイオリスティック (biolistic) 注射器、粒子加速器 (すなわち、「遺伝子銃」)、ゲルフォームスポンジデポ (depot)、他の市販デポ (depot) 物質、浸透圧ポンプ (例えば、Alzaミニポンプ)、経口用または坐剤用の固形 (錠剤または丸剤) 薬学的処方物、および手術中のデカンティング (decanting) または局所適用を含む。例えば、ラット肝臓およびラット脾臓へのリン酸カルシウム沈澱した裸のプラスミドの直接注射、または門脈へのタンパク質被覆プラスミドの直接注射は、ラット肝臓における外来遺伝子の遺

伝子発現をもたらした (Kanedaら、Science、243:375(1989))。

【0388】

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

【0389】

局所投与の別の方法は、本発明のポリヌクレオチド構築物を外科的創傷中または外科的創傷の周囲に接触させることである。例えば、患者は手術を経験し得、そしてこのポリヌクレオチド構築物はその創傷の内側の組織の表面上にコーティングされ得るか、またはこの構築物が、その創傷の内側の組織の領域に注入され得る。

【0390】

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

【0391】

全身投与の好ましい方法としては、静脈内注射、エアロゾル、経口および経皮(局所的)送達が挙げられる。当該分野で標準的な方法を使用して、静脈内注射が実行され得る。当該分野で標準的な方法を使用して、エアロゾル送達もまた実行され得る(例えば、本明細書中で参考として援用される、Striblingら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277~11281(1992)を参照のこと)。動物の腸内の消化酵素による分解に耐える能力をもつキャリアに対して本発明のポリヌクレオチド構築物を複合体形成することにより、経口送達は実行され得る。そのようなキャリアの例としては、当該分野で公知であるもののような、プラスチックカプセルまたは錠剤が挙げられ

る。皮膚内へ通過可能な親油性試薬（例えば、DMSO）と本発明のポリヌクレオチド構築物を混合することによって、局所的送達は実行され得る。

【0392】

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

【0393】

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

【0394】

（生物学的活性）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストをアッセイに使用し、1つ以上の生物学的活性について試験し得る。本発明のこれらのポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはアゴニストもしくはアンタゴニストが特定のアッセイにおいて活性を示す場合、これらの分子はその生物学的活性に関連した疾患に関与し得るようである。従って、このポリヌクレオチドおよびポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、その関連した疾患を処置し得る。

【0395】

タンパク質の免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、タンパク質-タンパク質相互作用、細胞接着、およびシグナル伝達に関連する、生物学的活性に関与すると考えられる。従って、本発明の組成物（本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体を含む）は、異常な免疫グロブリンスーパーファミリー活性に関連する疾患および/または障害の診断、検出および/または処置において使用され得る。好ましい実施

形態において、本発明の組成物（本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体を含む）は、血液障害（例えば、以下の「免疫活性」および「心臓血管障害」で記載されるような）、過剰増殖障害（例えば、増殖細胞の転移、および/または以下の「神経学的障害」で記載されるような）、神経障害（例えば、以下の「神経学的疾患」に記載されるような）に関連する疾患および/または障害の、診断、検出および/または処置において使用され得る。従って、本発明のポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、シグナル伝達、タンパク質-タンパク質相互作用、細胞接着、および神経学的障害を含むがこれらに限定されない、活性に関連する疾患および/または障害の診断、検出および/または処置において有用である。

【0396】

より一般的には、この遺伝子に対応するポリヌクレオチド、翻訳産物および抗体は、以下の系に関連する疾患および/または障害の診断、検出および/または処置に有用であり得る。

【0397】

（免疫活性）

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、例えば、免疫細胞の増殖、分化、もしくは動員（走化性）を活性化または阻害することにより、免疫系の疾患、障害および/または状態の処置、予防および/または診断において有用であり得る。免疫細胞は、造血と呼ばれるプロセスを介して発達し、多能性幹細胞から骨髄性細胞（血小板、赤血球、好中球およびマクロファージ）およびリンパ系細胞（Bリンパ球およびTリンパ球）を生成する。これら免疫の疾患、障害および/または状態の病因は、遺伝的、体細胞的（somatic）（例えば、癌およびいくつかの自己免疫性の疾患）、後天的（例えば、化学療法もしくは毒素による）または感染的であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の免疫系の疾患または障害のマーカ-または検出物質（detector）として使用され得る。

【0398】

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

【0399】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストをまた使用して、止血性活性(出血を止めること)または血栓崩壊活性(血餅形成)を調節し得る。例えば、止血活性または血栓崩壊活性を増大させることにより、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、血液凝固の疾患、障害、および/または状態(例えば、無線維素原血症、因子欠損症)、血液血小板の疾患、障害および/または状態(例えば、血小板減少症)、あるいは外傷、手術または他の原因から生じる創傷を処置または予防し得る。あるいは、止血活性または血栓崩壊活性を減少させ得る本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、凝血を阻害または溶解し得る。心臓発作(梗塞)、発作(stroke)または瘢痕の処置または予防において、これらの分子は重要であり得る。

【0400】

自己免疫性の障害の処置、予防および/または診断において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニ

ストはまた、有用であり得る。多くの自己免疫性の障害は、免疫細胞によって外来性物質として不適切に自己を認識することから生じる。この不適切な認識は、宿主組織の破壊をもたらす免疫応答を引き起こす。従って、免疫応答、特にT細胞の増殖、分化または走化性を阻害し得る本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの投与は、自己免疫性の障害の予防において効果的な治療であり得る。

【0401】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置、予防および/または診断され得る自己免疫疾患または自己免疫障害としては、以下のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない：自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性新生児血小板減少、続発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性血球減少症、溶血性貧血、抗リン脂質症候群、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、心筋炎、再発性多発性軟骨炎、リウマチ性心疾患、糸球体腎炎（例えば、IgA腎症）、多発性硬化症、神経炎、ブドウ膜炎眼炎（Uveitis Ophthalmia）、多発性内分泌腺症、紫斑病（例えば、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病）、ライター病、スティッフマン症候群、自己免疫性肺炎症、自閉、ギヤンバレー症候群、インスリン依存性真性糖尿病、および自己免疫性炎症性眼（autoimmune inflammatory eye）、自己免疫性甲状腺炎、甲状腺機能低下症（すなわち、橋本甲状腺炎）、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、天疱瘡、レセプター自己免疫（例えば、（a）グレース病、（b）重症筋無力症、および（c）インスリン抵抗性）、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、慢性関節リウマチ、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症、混合結合組織病、多発性筋炎/皮膚筋炎、悪性貧血、続発性アディソン病、不妊症、糸球体腎炎（例えば、原発性糸球体腎炎およびIgA腎症）、水泡性類天疱瘡、シェーグレン症候群、真性糖尿病、ならびにアドレナリン作用薬耐性（喘息または嚢胞性線維症を伴うアドレナリン作用薬耐性を含む）、活動性慢性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、他の内分泌線不全、白斑、脈管炎、心筋梗塞後症候群（post-MI）、心臓切新開症候群、じんま疹、アトピー性皮膚炎、喘息、炎症性ミオパシーならびに他の炎症障害、肉芽腫性障害、変性障害および萎縮性障害。

【0402】

(おそらく)本発明の組成物により処置、予防および/または診断され得るさらなる自己免疫障害としては、慢性関節リウマチ(例えば、関節における免疫複合体により、しばしば特徴付けられる)、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症(例えば、核小体抗体および他の核抗体により、しばしば特徴付けられる)、混合結合組織病(例えば、抽出可能な核抗原(例えば、リボ核タンパク)に対する抗体により、しばしば特徴付けられる)、多発性筋炎(例えば、非ヒストンANAにより、しばしば特徴付けられる)、悪性貧血(例えば、抗壁細胞抗体、抗ミクロソーム抗体、および抗内因子抗体により、しばしば特徴付けられる)、続発性アデyson病(例えば、体液媒介性副腎細胞傷害性および細胞媒介性副腎細胞傷害性により、しばしば特徴づけられる)、不妊症(例えば、抗精子抗体により、しばしば特徴付けられる)、糸球体腎炎(例えば、糸球体基底膜抗体もしくは免疫複合体により、しばしば特徴付けられる)、水泡性類天疱瘡(例えば、基底膜におけるIgGおよび補体により、しばしば特徴付けられる)、シェーグレン症候群(例えば、複数の組織抗体および/または特定の非ヒストンANA(SS-B)により、しばしば特徴付けられる)、真性糖尿病(例えば、細胞媒介性島細胞抗体および体液性島細胞抗体により、しばしば特徴付けられる)、ならびにアドレナリン作用薬耐性(喘息または嚢胞性線維症を伴うアドレナリン作用薬耐性を含む)(例えば、 - アドレナリン作用性レセプター抗体により、しばしば特徴付けられる)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0403】

(おそらく)本発明の組成物により処置、予防および/または診断され得るさらなる自己免疫障害としては、活動性慢性肝炎(例えば、平滑筋抗体により、しばしば特徴付けられる)、原発性胆汁性肝硬変(例えば、ミトコンドリア抗体により、しばしば特徴付けられる)、他の内分泌線不全(例えば、いくつかの場合において特定の組織抗体によって、しばしば特徴付けられる)、白斑(例えば、メラノサイト抗体により、しばしば特徴付けられる)、脈管炎(例えば、血管壁におけるIgGおよび補体、ならびに/または低血清補体により、しばしば特徴付けられる)、心筋梗塞後症候群(post-MI)(例えば、心筋抗体により

、しばしば特徴付けられる)、心臓切開症候群(例えば、心筋抗体により、しばしば特徴付けられる)、じんま疹(例えば、IgEに対するIgG抗体およびIgM抗体により、しばしば特徴付けられる)、アトピー性皮膚炎(IgEに対するIgG抗体およびIgM抗体により、しばしば特徴付けられる)、喘息(例えば、IgEに対するIgG抗体およびIgM抗体により、しばしば特徴付けられる)、ならびに他の多くの炎症障害、肉芽腫性障害、変性障害および萎縮性障害が挙げられるが、これらに限定されない。

【0404】

好ましい実施形態において、上記の疾患および障害に関連する、自己免疫疾患および自己免疫障害および/または自己免疫状態は、例えば、本発明のアンタゴニストもしくはアゴニスト、ポリペプチドもしくはポリペプチド、または抗体を使用して、処置、予防および/または診断される。

【0405】

好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、B細胞および/またはT細胞の免疫不全個体間の免疫応答性をブーストするための薬剤として使用され得る。

【0406】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ならびに/あるいはそのアゴニストを投与することによって、回復または処置され得るB細胞免疫欠損としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 重度の複合型免疫欠損(SCID) - X連鎖、SCID常染色体の、アデノシンデアミナーゼ欠損(ADA欠損)、X連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)、ブルートン病(Bruton's disease)、先天性無ガンマグロブリン血症、X連鎖乳児無ガンマグロブリン血症、後天性無ガンマグロブリン血症、成体開始無ガンマグロブリン血症、遅発性無ガンマグロブリン血症、異常ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症、新生児期の一過性の低ガンマグロブリン血症、不特定の低ガンマグロブリン血症、無ガンマグロブリン血症、分類不能型免疫不全(CVI)(後天性)、ヴィスコット オールドリッチ症候群(WAS)、IgM上昇を伴うX

連鎖免疫不全 (X - l i n k e d i m m u n o d e f i c i e n c y w i t h h y p e r I g M)、I g M上昇を伴う非X連鎖免疫不全、選択的I g A欠損、I g Gサブクラス欠損 (I g A欠損を伴うか、または伴わない)、通常または上昇したI g sを伴う抗体欠損、胸腺腫を伴う免疫欠損、L g重鎖欠失、鎖欠損、B細胞リンパ増殖性障害 (B L P D)、選択性I g M免疫欠損、劣性無ガンマグロブリン血症 (スイス型)、網状発育不全、新生児好中球減少症、重度の先天性白血球減少症、免疫欠損を伴う胸腺リンパ形成不全症 - 発育不全または形成異常、毛細血管拡張性運動失調、短四肢化小人症、X連鎖リンパ増殖性症候群 (X L P)、I g sを伴うネゼロフ症候群 - 複合型免疫欠損、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損 (P N P)、M H CクラスI I欠損 (不全リンパ球症候群) および重度の複合型免疫欠損。

【 0 4 0 7 】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ならびに / あるいはそのアゴニストを投与することによって、回復または処置され得るT細胞欠損としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：例えば、D i G e o r g e 奇形、胸腺発育不全、第3および第4咽頭嚢症候群、2 2 q 1 1 . 2 欠損、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ナチュラルキラー細胞の欠損 (N K)、特発性C D 4 + Tリンパ球減少、優性T細胞欠損 (非特異的) を伴う免疫欠損、および細胞媒介免疫の非特異的免疫欠失。特定の実施形態において、D i G e o r g e 奇形またはD i G e o r g e 奇形関連状態を、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを投与することによって回復または処置される。

【 0 4 0 8 】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ならびに / あるいはそのアゴニストを投与することによって、回復または処置され得る他の免疫不全としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：重症複合型免疫不全 (S C I D ; 例えば、X連鎖S C I D、常染色体S C I D、およびアデノシンデアミナーゼ不全症)、毛細血管拡張性運動失調、ヴィスコット - オールドリッチ症候群、短肢性 (s h o r t - l i m b e r) 小人症、X連鎖リンパ球増多症候群 (X L

P)、ネゼロフ症候群(例えば、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ不全症)、MHCクラスII不全症。特定の実施形態において、毛細血管拡張性運動失調または毛細血管拡張性運動失調関連状態を、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを投与することによって回復または処置される。

【0409】

特定の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストを使用して、慢性関節リウマチが処置、予防、予後判定および/または診断される。別の特定の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストを使用して、全身性エリテマトーデスが処置、予防、予後判定および/または診断される。別の特定の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストを使用して、特発性血小板減少性紫斑病が処置、予防、予後判定および/または診断される。別の特定の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストを使用して、IgAネフロパシーが処置、予防、予後判定および/または診断される。好ましい実施形態において、自己免疫疾患および障害、ならびに/または上記に列挙される疾患および障害に関連する状態は、本発明のタンパク質に対する抗体を使用して処置、予防、予後判定および/または診断される。

【0410】

同様に、アレルギー性の反応および状態(例えば、喘息(特に、アレルギー性喘息))または他の呼吸性の問題はまた、本発明のポリペプチド、抗体、またはポリヌクレオチド、および/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを使用して処置、予防、予後判定および/または診断され得る。さらに、これらの分子は、アナフィラキシー、抗原性分子に対する過敏症、または血液型不適合を処置、予防、予後判定および/または診断するために使用され得る。

【0411】

さらに、炎症性状態もまた、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに / あるいはアゴニストまたはアンタゴニストを用いて、処置、診断、予防、および / または予後判定され得る。このような炎症性状態としては、例えば以下が挙げられるがこれらに限定されない：呼吸障害（例えば、喘息およびアレルギー）；胃腸の障害（例えば、炎症性腸疾患）；癌（例えば、胃癌、卵巣癌、肺癌、膀胱癌、肝臓癌および乳癌）；CNS障害（例えば、多発性硬化症、血液脳関門透過性、虚血性脳傷害および / または発作、外傷性脳傷害、神経変性傷害（例えば、パーキンソン病およびアルツハイマー病）、AIDS関連痴呆、およびプリオン疾患）；心臓血管障害（例えば、アテローム硬化症、心筋炎、心臓血管疾患、および心肺バイパス合併症）；ならびに、炎症（例えば、慢性肝炎（BおよびC）、慢性間接リウマチ、痛風、外傷、敗血症性ショック、膵炎、サルコイドーシス、皮膚炎、腎臓虚血再灌流障害、グレーヴス病、全身性エリテマトーデス、真性糖尿病（すなわち、1型糖尿病）、および同種異系の移植拒絶）によって特徴付けられる多くのさらなる疾患、状態、および障害。

【0412】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体またはポリヌクレオチド、および / あるいはそれらのアゴニストまたはアンタゴニストは、移植拒絶、対宿主性移植片病、自己免疫および炎症性疾患（例えば、免疫複合体に誘導される脈管炎、糸球体腎炎、溶血性貧血、重症筋無力症、II型コラーゲン誘導関節炎、実験的アレルギー性および超急性異種移植片拒絶、慢性間接リウマチ、ならびに全身性エリテマトーデス（SLE）を、処置、診断、予防、および / または予後判定するのに有用である。器官の拒絶は、免疫応答を介して移植組織の宿主免疫細胞の破壊によって生じる。同様に、免疫応答はまた、GVHDに関与するが、しかしこの場合は、外来移植された免疫細胞は、宿主組織を破壊する。免疫応答（特に、T細胞の活性化、増殖、分化、または走化性）を阻害する本発明のポリペプチド、抗体、またはポリヌクレオチド、および / あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、器官拒絶またはGVHDの予防における有効な治療であり得る。

【0413】

同様に、本発明のポリペプチド、抗体、またはポリヌクレオチド、および/あるいは本発明のアゴニストまたはアンタゴニストはまた、炎症を調節、診断または予後判定するために使用され得る。例えば、本発明のポリペプチド、抗体またはポリヌクレオチド、および/あるいは本発明のアゴニストまたはアンタゴニストが、炎症性応答に關与する細胞の活性化、増殖および/または分化を阻害するので、これらの分子は、慢性状態および急性状態の両方の炎症性状態（感染に關連する炎症（例えば、敗血症性ショック、敗血症、または全身性炎症性応答症候群（SIRS））、虚血再灌流障害、内毒素死亡率、関節炎、補体媒介超急性拒絶、腎炎、サイトカインまたはケモカインに誘導される肺傷害、炎症性腸疾患、クローン病、およびサイトカイン（例えば、TNFまたはIL-1）の過剰産生によって生じる状態が挙げられるがこれらに限定されない）を処置、診断または予後判定するために使用され得る。

【0414】

本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、感染因子を処置、検出、および/または予防するために使用され得る。例えば、免疫応答を増加すること（特に、B細胞および/またはT細胞の増殖、活性化および/または分化を増加すること）によって、感染性疾患は、処置、検出、および/または予防され得る。免疫応答は、既存の免疫応答の増大によってか、または新しい免疫応答の開始によってかのいずれかで増加され得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストはまた、必ずしも免疫応答を誘発することなく、感染因子（感染因子を列挙する適用の節などを参照のこと）を直接阻害し得る。

【0415】

本発明のさらなる好ましい実施形態には、以下の適用におけるポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストの使用が挙げられるが、これらには限定されない：

免疫系をブーストするため、1以上の抗体（例えば、IgG、IgA、IgMおよびIgE）の増加した量を産生するため、より高い親和性の抗体産物（例え

ば、I g G、I g A、I g MおよびI g E) を誘導するため、および/または免疫応答を増大するための、動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ(m i c r o p i g)、ニワトリ、ラクダ、ヤギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類およびヒト、最も好ましくはヒト)への投与。

【0416】

機能的な内因性抗体分子を産生することが不可能であるか、または別の偽感染性の内因性免疫系を有するが、別の動物からの再構築または部分的に再構築される免疫系的手段により、ヒト免疫グロブリン分子を産生することが可能である動物(上に列挙される動物を含むが、これらに限定されず、トランスジェニック動物もまた含む)への投与。(例えば、公開されたP C T出願WO 98/24893、WO/9634096、WO/9633735、およびWO/9110741を参照のこと)。

【0417】

特定の抗原に対する免疫応答性を増大するワクチンアジュバント。

【0418】

腫瘍特異的免疫応答を増大するためのアジュバント。

【0419】

抗ウイルス免疫応答を増大するためのアジュバント。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗ウイルス免疫応答は、ウイルスおよび本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の疾患または症状に関連するウイルスを含む。特定の実施形態において、本発明の組成物は、ウイルス、疾患、または症状(これは、A I D S、髄膜炎、デング熱、E B V、および肝炎(例えば、B型肝炎)からなる群から選択される)に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、ウイルス、疾患、または症状(これは、H I V / A I D S、R Sウイルス、デング熱、ロタウイルス、日本脳炎、インフルエンザAおよびB、パラインフルエンザ、麻疹、サイトメガロウイルス、狂犬病、ジュニン(J u n i n)、チクングニヤ、リフトバレー熱、単純疱疹、および黄熱病からなる群から選択

される)に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【0420】

抗細菌免疫応答または抗真菌免疫応答を増大するためのアジュバント。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗細菌免疫応答または抗真菌免疫応答としては、細菌または真菌、および本明細書中に記載されるか、またはさもなくば当該分野で公知の疾患または症状に関連する細菌または真菌が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状(これは、破傷風、ジフテリア、ボツリスム、およびB型髄膜炎からなる群から選択される)に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。特定の好ましい実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状(これは、*Vibrio cholerae*、*Mycobacterium leprae*、*Salmonella typhi*、*Salmonella paratyphi*、*Meisseria meningitidis*、*Streptococcus pneumoniae*、Group B *streptococcus*、*Shigella spp.*、*Enterotoxigenic Escherichia coli*、*Enterohemorrhagic E. coli*、*Borrelia burgdorferi*、および*Plasmodium*(マラリア)からなる群から選択される)に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【0421】

抗寄生生物免疫応答を増大するためのアジュバント。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗寄生生物免疫応答としては、寄生生物、および本明細書中に記載されるかまたはさもなくば当該分野で公知の疾患または症状に関連する寄生生物が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、寄生生物に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、*Plasmodium*(マラリア)に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

【0422】

病原に対するB細胞応答性の刺激物質として。

【0423】

T細胞のアクチベーターとして。

【0424】

免疫抑制性治療を受ける前の、個体の免疫状態を増大させる薬剤として。

【0425】

より高い親和性抗体を誘導するための薬剤として。

【0426】

血清免疫グロブリン濃度を増加するための薬剤として。

【0427】

免疫無防備状態の個体の回復を促進するための薬剤として。

【0428】

高齢の集団の間の免疫応答性をブーストするための薬剤として。

【0429】

骨髄移植および/または他の移植(例えば、同種異系または外因性の器官移植)の前、間、または後の免疫系エンハンサーとして。移植に関して、本発明の組成物は、移植の前、同時、および/または後に投与され得る。特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植の後、T細胞集団の回復の開始前に投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植の後、T細胞集団の回復の開始後であるが、B細胞集団の完全な回復の前に最初に投与される。

【0430】

B細胞機能の後天的欠損を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび/またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって回復または処置され得る、B細胞機能の後天的欠損を生じる状態としては、HIV感染、AIDS、骨髄移植、およびB細胞慢性リンパ球性白血病(CLL)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0431】

一時的な免疫不全を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび/またはそれらのアゴニスト

もしくはアンタゴニストを投与することによって回復または処置され得る、一時的な免疫不全を生じる状態としては、ウイルス感染（例えば、インフルエンザ）からの回復、栄養失調に関連する状態、感染性単核細胞症からの回復、またはストレスに関連する状態、麻疹からの回復、輸血からの回復、手術からの回復が挙げられるが、これらに限定されない。

【0432】

単球、樹状細胞および/またはB細胞による抗原提示のレギュレーターとして。1つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボで抗原提示を増強するかまたは抗原提示をアンタゴナイズする。さらに、関連する実施形態において、この抗原提示の増強またはアンタゴナイズは、抗腫瘍処置としてかまたは免疫系を調節するために有用であり得る。

【0433】

個体の免疫系を、TH1細胞性応答とは反対に、体液性応答（すなわち、TH2）の発生に指向するための薬剤として。

【0434】

腫瘍増殖を誘導し、従って、腫瘍を抗腫瘍性薬剤に対してより感受性にするための手段として。例えば、多発性骨髄腫は、緩慢な細胞分裂（dividing）の疾患であり、従って、実質的に全ての抗腫瘍性レジメンに対して不応性である。これらの細胞は、より迅速に増殖させた場合、これらの感受性プロフィールは、おそらく変化するであろう。

【0435】

AIDS、慢性リンパ球障害および/または分類不能性免疫不全症（Common Variable Immunodeficiency）のような病理におけるB細胞の産生の刺激因子として。

【0436】

手術、外傷または遺伝的欠陥後のリンパ組織の生成および/または再生のための治療として。

【0437】

S C I D患者の間で観察されるような免疫不全を生じる遺伝性の障害のための遺伝子ベースの治療として。

【0438】

本発明のポリペプチドに対して免疫媒介応答を阻害または増強するための抗体を生成するための抗原として。

【0439】

T細胞を活性化する方法として。

【0440】

単球に影響を及ぼす寄生生物疾患（例えば、リーシュマニア属（*Leishmania*））に対して防御するために単球/マクロファージを活性化する方法として。

【0441】

移植前の骨髄サンプルの前処理として。このような処理は、B細胞提示を増加し、従って回復を加速する。

【0442】

本発明のポリペプチドによって誘発される分泌サイトカインを調節する方法として。

【0443】

さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、ならびに/あるいはそれらのアゴニストは、I g E 媒介アレルギー応答を処置または予防するために使用され得る。このようなアレルギー反応としては、ぜん息、鼻炎および湿疹が挙げられるが、これらに限定されない。

【0444】

上記の適用の全ては、獣医学的医療に適用され得る。

【0445】

本発明のアンタゴニストとしては、例えば結合および/または阻害性の抗体、アンチセンス核酸、またはリボザイムが挙げられる。これらは、上記のリガンドの活性の多くを無効にし、そして以下のような臨床的または実用的な適用を見出すことが予測される。

【0446】

外来因子または自己に対する種々の局面の免疫応答をブロックする手段として。例としては、狼瘡および関節炎のような自己免疫障害、ならびに皮膚アレルギー、炎症、腸疾患、損傷および病原体に対する免疫応答が挙げられる。

【0447】

自己免疫疾患（例えば、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデスおよびMS）に関連するB細胞増殖およびIg分泌を妨げるための治療として。

【0448】

内皮細胞におけるB細胞および/またはT細胞の遊走のインヒビターとして。この活性は、組織構造または同属の応答を破壊し、そして例えば、免疫応答の破壊および敗血症のブロックにおいて有用である。

【0449】

対宿主性移植片病または移植片拒絶のインヒビターとして。

【0450】

ALL、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、プラズマ細胞腫、多発性骨髄腫、バーキットリンパ腫およびEBV変換性（EBV-transformed）疾患のようなB細胞および/またはT細胞の悪性疾患のための治療。

【0451】

未定量有意性の単一クローン性高ガンマグロブリン血症（monoclonal gammopathy of undetermined significance）（MGUS）、ヴァルデンストレーム疾患、関連する特発性単一クローン性高ガンマグロブリン血症、およびプラズマ細胞腫のような疾患における、慢性の高ガンマグロブリン血症事象のための治療。

【0452】

ラージB細胞リンパ腫の細胞増殖を減少するための治療。

【0453】

慢性骨髄性白血病に関連するB細胞およびIgの関与を減少する手段。

【0454】

免疫抑制剤。

【0455】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボでのI g E濃度を調節するために使用され得る。

【0456】

別の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストの投与は、ぜん息、鼻炎および湿疹を含むがこれらに限定されない、I g E媒介アレルギー反応を処置または予防するために使用され得る。

【0457】

アゴニストおよびアンタゴニストは、例えば、上記のような、薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物において使用され得る。

【0458】

アゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、特定の自己免疫疾患および慢性炎症疾患および感染性疾患における、マクロファージおよびその前駆体、ならびに好中球、好塩基球、Bリンパ球およびいくつかのT細胞サブセット（例えば、活性化T細胞およびCD8細胞傷害性T細胞ならびにナチュラルキラー細胞）の、ポリペプチド走化性および活性化を阻害するために使用され得る。自己免疫疾患の例は、本明細書中に記載され、これらには、多発性硬化症およびインスリン依存性糖尿病が挙げられる。アンタゴニストまたはアゴニストはまた、例えば、単核食細胞の漸増および活性化を妨げることによって、珪肺症、サルコイドーシス、特発性肺線維症を含む、感染性疾患を処置するために使用され得る。これらはまた、例えば好酸球の産生および遊走を妨げることによって、特発性好酸球増多症候群を処置するために使用され得る。アンタゴニストまたはアゴニストはまた、例えば動脈壁における単球浸潤を妨げることによって、アテローム性動脈硬化症を処置するために使用され得る。

【0459】

本発明のポリペプチドに対する抗体は、ARDSを処置するために使用され得

る。

【0460】

本発明のアゴニストおよび/またはアンタゴニストはまた、創傷および組織の修復の刺激、新脈管形成の刺激、血管またはリンパの疾患または障害の修復の刺激における用途を有する。さらに、本発明のアゴニストおよびアンタゴニストは、粘膜表面の再生を刺激するために使用され得る。

【0461】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに/あるいはそれらのアゴニストは、原発性または後天性の免疫不全症、欠損性の血清免疫グロブリン産生、再発性の感染および/または免疫機能不全によって特徴付けられる障害を処置または予防するために使用される。さらに、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに/あるいはそれらのアゴニストは、関節、骨、皮膚および/または耳下腺の感染、血液由来の感染（例えば、敗血症、髄膜炎、敗血症性関節炎および/または骨髄炎）、自己免疫疾患（例えば、本明細書中に開示されるような自己免疫疾患）、炎症性障害、および悪性疾患、ならびに/あるいはこれらの感染、疾患および/または悪性疾患に関連する任意の疾患または障害または状態（CVID、他の原発性免疫不全、HIV疾患、CLL、再発性気管支炎、静脈洞炎、中耳炎、結膜炎、肺炎、肝炎、髄膜炎、帯状ヘルペス（例えば、重篤な帯状ヘルペス）および/またはニューモシスティスを含むが、これらに限定されない）を処置または予防するために使用され得る。

【0462】

別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、分類不能性免疫不全症（Common Variable Immunodeficiency）（「CVID」；「後天性無ガンマグロブリン血症」および「後天性低ガンマグロブリン血症」としても公知である）またはこの疾患のサブセットを有する個体を、処置および/または診断するために使用される。

【0463】

特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体な

らびに / あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、(1) 癌または新形成および(2) 自己免疫細胞または組織関連の癌または新形成を、処置、診断および / または予防するために使用され得る。好ましい実施形態において、本明細書中に記載されるような、毒素または放射化性同位体に結合体化された本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに / あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、急性骨髄性白血病を処置、診断、および / または予防するために使用され得る。さらに好ましい実施形態において、本明細書中に記載されるような、毒素または放射化性同位体に結合体化された本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体ならびに / あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、および / またはホジキン病を処置、診断、および / または予防するために使用され得る。

【0464】

別の特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および / またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、選択的IgA欠損、ミエロペルオキシダーゼ欠損、C2欠損、毛細管拡張性運動失調、DiGeorge奇形、分類不能型免疫不全(CVI)、X連鎖無ガンマグロブリン血、重症複合免疫不全(SCID)、慢性肉芽腫症(CGD)、およびWiskott-Aldrich症候群を処置、診断、予後判定、および / または予防し得る。

【0465】

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

【0466】

好ましい実施形態において、上記に列挙した疾患および障害に関連する自己免疫性の疾患および障害ならびに／あるいは状態は、本発明のポリペプチドに対する抗体を使用して、処置、予後診断、予防および／または診断される。

【0467】

B細胞免疫欠損の個体（例えば、部分的または完全な脾摘出を受けた個体）間の免疫応答性をブーストするための薬剤として。

【0468】

さらに、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストは、アポトーシスに影響し得、従って、細胞生存の増大あるいはアポトーシスの阻害に関連する多くの疾患の処置において有用である。例えば、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、細胞生存の増大あるいはアポトーシスの阻害に関連する疾患としては、癌（例えば、濾胞性リンパ腫、p53変異を有する癌腫、およびホルモン依存性腫瘍、これらは以下：結腸癌、心臓腫瘍、膵臓癌、黒色腫、網膜芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、肺癌、腸の癌、精巣癌、胃癌、神経芽細胞腫、粘液腫、筋腫、リンパ腫、内皮腫、骨芽細胞腫、骨巨細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、腺腫、乳癌、前立腺癌、カポージ肉腫および卵巣癌を含むが、これらに限定されない）；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病（Behcet's disease）、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ）およびウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、ポックスウイルスおよびアデノウイルス）、炎症、対宿主性移植片病、急性移植片拒絶、ならびに慢性移植片拒絶、が挙げられる。好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストは、特に上記に列挙される癌の増殖、進行、および／または転移を阻害するために使用される。

【0469】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび／またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態としては、悪性疾患ならびに以下のような関連する障害の進行および／または

転移が挙げられるが、これらに限定されない：白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む）を含む）ならびに慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病））、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、ならびに固形腫瘍（肉腫および癌腫（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（*endotheliosarcoma*）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髓芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫（*menangioma*）、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫）を含むが、これらに限定されない）。

【0470】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび/またはアンタゴニストによって処置または検出され得る、アポトーシスの増大に関連する疾患としては、以下が挙げられる：AIDS；神経変性障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または以前に関連した疾患）；自己免疫障害（例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病（*Behcet's disease*）、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ）、脊髄形成異常症候群（例えば、再生不良性貧血）、対宿主性移植片病、虚血性傷害（心筋梗塞、発作および再灌流傷害によって生じるようなもの）、肝臓傷害（例えば、肝炎関連肝臓傷害、虚血/再灌流傷害、胆汁うっ滞（*cholestosis*）（胆管傷害）および肝臓癌）；毒物誘導性肝臓疾患（アルコールによって引き起こされるようなもの）、敗血

症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【0471】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ならびに／あるいはアンタゴニストによって検出および／または処置され得る過剰増殖の疾患および／または障害としては、肝臓、腹部、骨、乳房、消化器系、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、ならびに泌尿生殖器に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0472】

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

【0473】

（過剰増殖障害）

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、新生物を含む過剰増殖障害を処置または検出し得る。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、直接的または間接的な相互作用を介してこの障害の増殖を阻害し得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、過剰増殖障害を阻害し得る他の細胞を増殖し得る。

【0474】

例えば、免疫応答を増大させること、特に過剰増殖障害の抗原性の質を増大させることによって、またはT細胞を増殖、分化、もしくは動員することによって、過剰増殖障害を処置し得る。既存の免疫応答を増強するか、または新たな免疫

応答を開始するかのいずれかによって、この免疫応答を増大させ得る。あるいは、免疫応答を減少させることもまた、化学療法剤のような、過剰増殖障害を処置する方法であり得る。

【0475】

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

【0476】

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

【0477】

本発明のポリヌクレオチドを利用する1つの好ましい実施形態は、本発明および/または融合タンパク質もしくはそのフラグメントを用いる遺伝子治療によって、異常な細胞分裂を阻害することである。

【0478】

従って、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを異常に増殖している細胞に挿入することによって、細胞増殖性障害を処置するための方法を提供し、ここでこのポリヌクレオチドはこの発現を示す。

【0479】

本発明の別の実施形態は、個体における細胞増殖性障害を処置する方法を提供し、この方法は、本発明の1以上の活性遺伝子コピーを異常に増殖している1つ

の細胞または複数の細胞に投与することを包含する。好ましい実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチドをコードするDNA配列の発現において有効な組換え発現ベクターを含むDNA構築物である。本発明の別の好ましい実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドをコードするDNA構築物は、レトロウイルスベクター、またはより好ましくは、アデノウイルスベクターを用いて、処理されるべき細胞に挿入される(G. J. Nabelら、PNAS 1999 96:324-326(これは、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。最も好ましい実施形態においては、ウイルスベクターは不完全であり、非増殖性細胞ではなく増殖性細胞のみを形質転換する。さらに、好ましい実施形態においては、単独、または他のポリヌクレオチドと組み合わせられたかもしくは融合されたかのいずれかで増殖性細胞に挿入される本発明のポリヌクレオチドは、次いで外部刺激(すなわち、磁気、特異的小分子、化学的、または薬物投与など)を介して調節され得、これはこのポリヌクレオチドの上流のプロモーターに作用し、コードされたタンパク質産物の発現を誘導する。このように、本発明の有益な治療効果は、この外部刺激に基づいて明確に調節され得る(すなわち、本発明の発現を増加、減少、または阻害する)。

【0480】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、脈管形成タンパク質をコードする他のポリヌクレオチドと一緒に投与され得る。脈管形成タンパク質の例としては、酸性および塩基性の線維芽細胞増殖因子、VEGF-1、VEGF-2、VEGF-3、上皮増殖因子 および 、血小板由来の内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、腫瘍壊死因子 、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子、および一酸化窒素シンターゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【0481】

本発明のポリヌクレオチドは、発癌遺伝子または抗原の発現の抑制において有用であり得る。「発癌遺伝子の発現の抑制」によって、遺伝子の転写の抑制、遺伝子転写物の分解(プレメッセージ(pre-message)RNA)、スプ

ライシングの阻害、メッセンジャーRNAの破壊、タンパク質の翻訳後改変の予防、タンパク質の破壊、またはタンパク質の正常な機能の阻害が意図される。

【0482】

異常に増殖している細胞への局所的投与のために、本発明のポリヌクレオチドは当業者に公知の任意の方法によって投与され得、この方法としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション、細胞の微量注入、またはビヒクル（例えば、リポソーム、リポフェクチン）中で、または裸のポリヌクレオチドとして、または本明細書を通して記載される任意の他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリヌクレオチドは、公知の遺伝子送達系（例えば、レトロウイルスベクター（Gilboa, J. Virology 44:845 (1982); Hocke, Nature 320:275 (1986); Wilsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:3014）、ワクシニアウイルス系（Chakrabartyら、Mol. Cell Biol. 5:3403 (1985)）または当業者に公知の他の有効なDNA送達系（Yatesら、Nature 313:812 (1985)）があるが、これらに限定されない）によって送達され得る。これらの参考文献は、例示のみであり、本明細書中に参考として援用される。異常に増殖している細胞を特異的に送達またはトランスフェクトし、そして非分裂細胞を使わないために、当業者に公知のレトロウイルス、またはアデノウイルス（当該分野および本明細書中のいずれかに記載のような）送達系を使用することが好ましい。宿主DNA複製は、組み込みのためにレトロウイルスDNAを必要とし、レトロウイルスはそのライフサイクルに必要なレトロウイルス遺伝子を欠くために自己複製できないからである。このようなレトロウイルス送達系を本発明のポリヌクレオチドのために用いることによって、この遺伝子および構築物は異常に増殖している細胞を標的とし、そして非分裂正常細胞を使用しない。

【0483】

本発明のポリヌクレオチドは、注射針を疾患部位に直接導くために使用される画像化デバイスの使用によって、内部器管、体腔などにおける細胞増殖性障害/疾患部位へ直接送達され得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、外科的処置の

ときに疾患部位へ投与され得る。

【0484】

「細胞増殖性疾患」によって、器管、腔、または身体の部分の任意の1つまたは任意の組み合わせに影響を与える、任意のヒトまたは動物の疾患もしくは障害が意味され、これは良性であるか悪性であるかに関わらず、細胞、細胞の群、または組織の単一または複数の局所的異常増殖によって特徴付けられる。

【0485】

本発明のポリヌクレオチドが処置される細胞の増殖に対して生物学的に阻害する効果を有する限り、本発明のポリヌクレオチドの任意の量が投与され得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドの1つより多くを、同じ部位へ同時に投与することが可能である。「生物学的に阻害する」によって、細胞の部分的または全体的な増殖阻害および細胞の増殖 (proliferation) または成長 (growth) の速度における減少が意味される。生物学的阻害用量は、組織培養物における標的悪性細胞増殖もしくは異常増殖細胞増殖、動物および細胞培養物における腫瘍増殖に対する本発明のポリヌクレオチドの効果を評価することによって、または当業者に公知の任意の他の方法によって決定され得る。

【0486】

本発明はさらに、抗体に基づく治療に関し、この治療は、1以上の記載された障害を処置するために、抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体を哺乳動物（好ましくは、ヒト）患者に投与する工程を包含する。抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体のポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体を生成するための方法は、本明細書中のいずれかに詳細に記載される。このような抗体は、当該分野において公知であるかまたは本明細書中に記載されるような薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

【0487】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の要旨は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、身体中で局所的もしくは全体的に、または抗体の直接的な細胞傷害性によって（例えば、相補細胞 (CDC) またはエフェクター細胞 (ADCC) によって媒介されるように）結合させる工程を包含する。これらの

アプローチのいくつかは、以下により詳細に記載される。本明細書中に提供される教示によって、当業者は過度の実験なしで、本発明の抗体を診断目的、モニタリング目的または治療目的のために使用する方法を理解する。

【0488】

特に、本発明の抗体、フラグメントおよび誘導体は、本明細書中に記載されるような細胞増殖性障害および/または細胞分化障害を有しているかまたは発症している被験体を処置するために有用である。このような処置は、抗体もしくはフラグメント、誘導体またはそれらの結合体の単一または複数の用量を投与する工程を包含する。

【0489】

本発明の抗体は、他のモノクローナル抗体もしくはキメラ抗体と組み合わせて、またはリンホカインもしくは造血成長因子と組み合わせて有利に使用され得、例えば、これは抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増加させるために役立つ。

【0490】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して高親和性および/または強力なインビボ阻害および/または中和抗体、それらのフラグメントもしくは領域を、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド(それらのフラグメントを含む)に関するイムノアッセイおよびそれらに関連する障害の治療の両方のために使用することが好ましい。このような抗体、フラグメントまたは領域は、好ましくは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド(それらのフラグメントを含む)に対する親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ および 10^{-15}M 未満の解離定数すなわち K_d を伴う結合親和性が挙げられる。

【0491】

さらに、本明細書中のいずれかに記載されるように、本発明のポリペプチドは

、単独で、融合タンパク質として、または他のポリペプチドと組み合わせて、直接的または間接的のいずれかで、増殖性細胞または組織の新脈管形成の阻害において有用である。最も好ましい実施形態においては、この抗新脈管形成効果は、例えば造血性細胞、腫瘍特異的細胞（例えば、腫瘍関連マクロファージ）の阻害を通して、間接的に達成され得る（Joseph I Bら、J Natl Cancer Inst, 90(21):1648-53(1998)（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを指向する抗体はまた、直接的または間接的に新脈管形成の阻害を生じ得る（Witte Lら、Cancer Metastasis Rev. 17(2):155-61(1998)（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。

【0492】

本発明のポリペプチド（融合タンパク質を含む）またはそのフラグメントは、アポトーシスの誘導を通じた増殖性細胞または組織の阻害において有用であり得る。このポリペプチドは、デスドメインレセプター（例えば、腫瘍壊死因子（TNF）レセプター-1、CD95（Fas/APO-1）、TNFレセプター関連アポトーシス媒介タンパク質（TRAMP）およびTNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）レセプター-1およびレセプター-2）の活性化において、直接的または間接的のいずれかで、増殖性細胞および組織のアポトーシスを誘導するために作用し得る（Schulze-Osthoff Kら、Eur J Biochem 254(3):439-59(1998)（これは本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。さらに、本発明の別の好ましい実施形態においては、このポリペプチドは、他の機構を通して（例えば、アポトーシスを活性化する他のタンパク質の活性化において）、あるいは単独または小分子薬物もしくはアジュバント（例えば、アポプトニン（apoptonin）、ガレクチン、チオレドキシン、抗炎症タンパク質）との組み合わせのいずれかで、このタンパク質の発現の刺激を通して、アポトーシスを誘導し得る（例えば、Mutat Res 400(1-2):447-55(1998)、Med Hypotheses. 50(5):423-33(1998)、Chem Bi

ol Interact. Apr 24; 111-112: 23-34 (1998)、J Mol Med. 76(6): 402-12 (1998)、Int J Tissue React; 20(1): 3-15 (1998) (これらはすべて本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。

【0493】

本発明のポリペプチド(その融合タンパク質もしくはそのフラグメントを含む)は、増殖性細胞または組織の転移の阻害において有用である。阻害は、ポリペプチド、または本明細書中のいずれかに記載されるようなこのポリペプチドを指向する抗体の投与の直接的な結果として、あるいは間接的に(例えば、転移を阻害することが知られているタンパク質(例えば、4インテグリン)の発現の活性化)生じ得る(例えば、Curr Top Microbiol Immunol 1998; 231: 125-41(これは本明細書中に参考として援用される)を参照のこと)。本発明のこのような治療的效果は、単独、または小分子薬物もしくはアジュバントとの組み合わせのいずれかで達成され得る。

【0494】

別の実施形態においては、本発明は、本発明のポリペプチドを含有する組成物(例えば、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグに会合するポリペプチドまたはポリペプチド抗体を含有する組成物)を、本発明のポリペプチドを発現する標的細胞に送達する方法を提供する。本発明のポリペプチドまたはポリペプチド抗体は、疎水性、親水性、イオン性および/または共有結合性相互作用を介して、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグに会合し得る。

【0495】

本発明のポリペプチド、それらとの融合タンパク質またはそれらのフラグメントは、直接的(例えば、本発明のポリペプチドが増殖性抗原および免疫原に应答するために、免疫応答を「ワクチン接種した」場合に起こるように)、または間接的(例えば、この抗原および免疫原に対する免疫応答を増強することが知られているタンパク質(例えば、ケモカイン)の発現の活性化におけるように)のいずれかで、増殖細胞または組織の免疫原性および/または抗原性の増強において

有用である。

【0496】

(心臓血管障害)

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、四肢虚血のような末梢動脈疾患を含む、心臓血管障害を処置し得る。

【0497】

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

【0498】

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

血、心臓血管妊娠合併症 (cardiovascular pregnancy complications)、シミター症候群、心血管梅毒、および心血管結核 (cardiovascular tuberculosis) のような心臓病が挙げられる。

【0499】

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

【0500】

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

【0501】

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

【0502】

心筋性虚血としては、狭心症、冠動脈瘤、冠動脈硬化、冠動脈血栓症、冠動脈血管痙攣、心筋梗塞、および心筋気絶 (myocardial stunning

g) のような冠動脈疾患が挙げられる。

【0503】

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

【0504】

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

【0505】

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

【0506】

脳血管障害としては、頸動脈疾患、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、大脳無酸素症、大脳動脈硬化、大脳動静脈先天異常、大脳動脈疾患、大脳の塞栓症および血栓症、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、大脳出血、硬膜上血腫、硬膜下血腫、クモ膜下出血 (subarachnoid hemorrhage)、大脳梗塞、大脳虚血 (一過性を含む)、鎖骨下動脈盗血症

候群、室周白軟化症 (periventricular leukomalacia)、血管性頭痛、群発性頭痛、片頭痛、および椎骨基部 (vertebrobasilar) 機能不全が挙げられる。

【0507】

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

【0508】

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

【0509】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、危険な四肢虚血および冠状動脈疾患の処置に対して特に有効である。

【0510】

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

c)の一部として投与され得る。ポリヌクレオチドを送達する方法は本明細書中でより詳細に記載される。

【0511】

(抗新脈管形成活性)

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

【0512】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに本発明のアゴニストまたはアンタゴニストの投与による新生血管形成に関連する

疾患または障害の処置を提供する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置し得る悪性状態および転移性状態には、本明細書に記載の悪性疾患、固形腫瘍、および癌、ならびに当該分野で公知の他のもの（このような障害の総説については、Fishmanら、Medicine、第2版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。従って、本発明は、新脈管形成関連疾患および/または障害の処置の方法を提供し、この方法は、治療有効量の、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを、その処置の必要な個体に投与する工程を包含する。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、癌または腫瘍を治療的に処置するために、種々のさらなる方法で利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストで処置され得る癌としては、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、膵臓癌、喉頭癌、食道癌、精巣癌、肝臓癌、耳下腺癌、胆管癌、結腸癌、直腸癌、頸部癌、子宮癌、子宮内膜癌、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌を含む固形腫瘍；原発性腫瘍および転移；黒色腫；膠芽腫；カポージー肉腫；平滑筋肉腫；非小細胞肺癌；結腸直腸癌；進行性(advanced)悪性疾患；および血液から生じる腫瘍（例えば、白血病）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、皮膚癌、頭頸部腫瘍、乳房腫瘍およびカポージー肉腫のような癌を処置するために、局所送達され得る。

【0513】

なお他の局面において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、例えば膀胱内投与によって膀胱癌の表面形態を処置するために利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、腫瘍に直接的に、または注射もしくはカテーテルを介して腫瘍部位付近に送達され得る。当然のことながら、当業者が理解するように、適切な投与様式は、処置されるべき癌によって変化する。他の送達様式は本明細書中において議論される。

【0514】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、癌に加えて、他の障害（新脈管形成を含む）を処置する際に有用であり得る。これらの障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫）；動脈硬化プラーク；眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオシス、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎（*uvietis*）および眼の翼状片（*Pterygia*）（異常な血管増殖））；慢性関節リウマチ；乾癬；遅延型創傷治癒；子宮内膜症；脈管形成；顆粒化；過形成性癬痕（ケロイド）；偽関節骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋の新脈管形成；冠状側副枝（*coronary collaterals*）；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性四肢新脈管形成；オースラー-ウェーバー（*Osler-Webber*）症候群；プラーク新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；血管線維腫；線維筋性形成異常；創傷顆粒化；クローン病；およびアテローム性動脈硬化症。

【0515】

例えば、本発明の1つの局面において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを過形成性癬痕またはケロイドに投与する工程を包含する、過形成性癬痕およびケロイドを処置するための方法が提供される。

【0516】

本発明の1つの実施形態において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、過形成性癬痕またはケロイドに、これらの病変の進行を妨げるために直接注射される。この治療は、過形成性癬痕およびケロイド（例えば、やけど）の発生を生じることが知られている状態の予防処置において特に価値があり、そして好ましくは、増殖期が進行する時間（最初の傷害の約14日後）を有した後であるが、過形成性癬痕またはケロイドの発生の前に開始される。上述のように、本発明はまた、眼の新生血管形成疾患（例えば、角膜新生血管形成、血管新生緑内障、増殖性糖尿病網膜症、水晶体後線維増殖お

よび黄斑変性を含む)を処置するための方法を提供する。

【0517】

さらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド(アゴニストおよび/またはアンタゴニストを含む)を用いて処置され得る新生血管形成に関連する眼の障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植新生血管形成、ならびに他の眼の炎症性疾患、眼の腫瘍、および脈絡膜または虹彩の新生血管形成に関連する疾患。例えば、Wal t m a nら、Am. J. O p h t h a l . 8 5 : 7 0 4 ~ 7 1 0 (1 9 7 8) およびG a r t n e rら、S u r v . O p h t h a l . 2 2 : 2 9 1 ~ 3 1 2 (1 9 7 8) による総説を参照のこと。

【0518】

従って、本発明の1つの局面において、治療有効量の化合物(上記)を患者に対して、血管の形成が阻害されるように角膜に投与する工程を包含する、角膜新生血管形成(角膜移植新生血管形成を含む)のような眼の新生血管形成疾患を処置するための方法が、提供される。簡潔には、角膜は、通常には血管を欠く組織である。しかし、特定の病的状態において、毛細血管は、縁の角膜周囲脈管叢から角膜に伸長し得る。角膜が血管化されるようになる場合、角膜はまた混濁されるようになり、患者の視力の衰えを生じる。角膜が完全に不透明になる(o p a c i t a t e)場合に、視力喪失が完全になり得る。広範な種々の障害は、例えば、以下を含む角膜新生血管形成を生じ得る:角膜感染(例えば、トラコーマ、単純ヘルペス角膜炎、リーシュマニア症およびオンコセルカ症)、免疫学的プロセス(例えば、移植片拒絶およびスティーヴンズ-ジョンソン症候群)、アルカリやけど、外傷、炎症(任意の原因による)、毒性および栄養欠乏状態、ならびにコンタクトレンズを装着することの合併症として。

【0519】

特に好ましい実施形態において、本発明は、生理食塩水(眼に用いる調製物において一般に使用される任意の保存剤および抗菌剤と組合せて)中で局所投与のために調製され得、そして点眼剤形態で投与され得る。溶液または懸濁液は、そ

の純粋な形態で調製され得、そして1日に数回投与され得る。あるいは、上記のように調製される抗脈管形成組成物はまた、角膜に直接投与され得る。好ましい実施形態において、抗脈管形成組成物は、角膜に結合する粘膜炎接着性ポリマーとともに調製される。さらなる実施形態において、抗脈管形成因子または抗脈管形成組成物は、従来のステロイド治療に対する補助剤として利用され得る。局所治療はまた、脈管形成応答（例えば、化学的やけど）を誘導する高い可能性を有することが公知である角膜病変において予防的に有用であり得る。これらの場合において、処置（おそらくステロイドと組み合わせられる）は、その後の合併症を予防するのを補助するために直ちに開始され得る。

【0520】

他の実施形態において、上記の化合物は、角膜支質に直接、顕微鏡の案内の下で眼科医によって注入され得る。好ましい注射部位は、個々の病巣の形態で変化し得るが、投与の目標は、脈管構造の前進している面に組成物を置くこと（すなわち、血管と正常な角膜との間に分散される）である。ほとんどの場合において、これは、前進している血管から角膜を「防御」するための縁周囲（*perilimbal*）角膜注射を含む。この方法はまた、角膜新生血管形成を予防的に防ぐために、角膜傷害の直後に利用され得る。この状況において、この物質は、角膜病巣とその所望されない潜在的な血液供給の縁との間に分散して縁周囲角膜に注射され得る。このような方法はまた、類似の様式で、移植された角膜の毛細血管浸潤を予防するために利用され得る。徐放形態において、注入は、1年に2～3回のみ必要とされ得る。ステロイドもまた、注入溶液に添加され、その注射自体から生じる炎症を低減し得る。

【0521】

本発明の別の局面において、患者に、血管の形成を阻害するように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、血管新生緑内障を処置するための方法が提供される。1つの実施形態において、化合物は、血管新生緑内障の早期形態を処置するために、眼に局所投与され得る。他の実施形態において、化合物は、前方角（*anterior chamber angle*）の領域に注入によって移植

され得る。他の実施形態において、化合物はまた、化合物が眼房水に連続的に放出されるように、任意の位置に置かれ得る。本発明の別の局面において、患者に、血管の形成が阻害されるように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、増殖性糖尿病性網膜症を処置するための方法が提供される。

【0522】

本発明の特に好ましい実施形態において、増殖性糖尿病性網膜症は、網膜におけるポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストの局所濃度を増加させるために、眼房水または硝子体への注入によって処置され得る。好ましくは、この処置は、光凝固を必要とする重篤な疾患の獲得の前に開始されるべきである。

【0523】

本発明の別の局面において、血管の形成が阻害されるように、患者に、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、水晶体後線維増殖症を処置するための方法が、提供される。化合物は、硝子体内注射を介して、および/または眼内移植を介して局所投与され得る。

【0524】

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

【0525】

さらに、このポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアゴニストで処置され得る障害および/または状態としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：固形腫瘍、血液由来の(blood born)腫瘍(例えば、白血病)、腫瘍転移、カポジ肉腫、良性腫瘍(例えば、血管腫、聴

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

【0526】

出産制限方法の1つの局面において、胎芽着床をブロックするに十分な化合物の量は、性交および受精が起こる前またはその後に投与され、従って産児制限の有効な方法、おそらく「事後用(morning after)」方法を提供する。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアゴニストはまた、月経を制御することにおいて使用され得るか、または子宮内膜症の処置における腹膜洗浄液として、もしくは腹膜移植のためのいずれかで投与され得る。

【0527】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアゴニストは、縫合(stitch)肉芽腫を予防するために、外科縫合に組み込まれ得る。

【0528】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアゴニストは、広範な種々の外科手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの局面において、組成物(例えば、スプレーまたはフィルムの形態において)は、悪性組織から正常な周囲の組織を分離するため、そして/または周囲の組織への疾患の広

がりを予防するために、腫瘍の除去の前に、領域をコートまたはスプレーするために利用され得る。本発明の他の局面において、組成物（例えば、スプレーの形態において）は、腫瘍をコートするため、または所望の場所において新脈管形成を阻害するために、内視鏡手順を介して送達され得る。本発明のなお他の局面において、本発明の抗脈管形成組成物でコートされている外科メッシュが、外科メッシュが利用され得る任意の手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの実施形態において、抗脈管形成組成物を有した外科メッシュレーデン（laden）は、構造に対する支持を提供するため、そして一定の量の抗脈管形成因子を放出するために、腹部癌切除手術の間（例えば、結腸切除の後）に利用され得る。

【0529】

本発明のさらなる局面において、癌の局所的再発およびその部位での新しい血管の形成が阻害されるように、切除後にポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアゴニストを腫瘍の切除縁に投与する工程を包含する、腫瘍切除部位を処置するための方法が提供される。本発明の1つの実施形態において、抗脈管形成化合物は、腫瘍切除部位に直接投与される（例えば、塗布、ブラッシング（brushing）、または他の方法で抗脈管形成化合物で腫瘍の切除縁をコートすることによって適用される）。あるいは、抗脈管形成化合物は、投与前に公知の外科ペーストに組み込まれ得る。本発明の特に好ましい実施形態において、抗脈管形成化合物は、悪性疾患についての肝切除後および神経外科手術後に適用される。

【0530】

本発明の1つの局面において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアゴニストは、広範な種々の腫瘍（例えば、乳房腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍および肝腫瘍を含む）の切除縁に投与され得る。例えば、本発明の1つの実施形態において、抗脈管形成化合物は、切除後に、神経学的腫瘍の部位に、その部位での新しい血管の形成が阻害されるように投与され得る。

【0531】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアゴニ

ストはまた、他の抗脈管形成因子とともに投与され得る。他の抗脈管形成因子の代表的な例としては以下が挙げられる：抗侵襲性因子、レチノイン酸およびその誘導体、パクリタキセル、スラミン、メタロプロテイナーゼ - 1 の組織インヒビター、メタロプロテイナーゼ - 2 の組織インヒビター、プラスミノゲン活性化インヒビター - 1、プラスミノゲン活性化インヒビター - 2 および種々の形態のより軽い「d群」遷移金属。

【0532】

より軽い「d群」遷移金属には、例えばバナジウム、モリブデン、タングステン、チタン、ニオブおよびタンタル種が挙げられる。そのような遷移金属種は、遷移金属錯体を形成し得る。上記の遷移金属種の適切な錯体としては、オキソ遷移金属錯体が挙げられる。

【0533】

バナジウム錯体の代表的な例としては、バナデート錯体およびバナジル錯体のようなオキソバナジウム錯体が挙げられる。適切なバナデート錯体としては、例えばメタバナジン酸アンモニウム、メタバナジン酸ナトリウムおよびオルトバナジン酸ナトリウムのようなメタバナデート錯体およびオルトバナデート錯体が挙げられる。適切なバナジル錯体としては、例えばバナジリアセチルアセトネートおよび硫酸バナジル（硫酸バナジルー水和物および硫酸バナジル三水和物のような硫酸バナジル水和物を含む）が挙げられる。

【0534】

タングステン錯体およびモリブデン錯体の代表的な例としてはまた、オキソ錯体が挙げられる。適切なオキソタングステン錯体としては、タングステート錯体およびタングステンオキシド錯体が挙げられる。適切なタングステート錯体としては、タングステン酸アンモニウム、タングステン酸カルシウム、タングステン酸ナトリウム二水和物およびタングステン酸が挙げられる。適切なタングステンオキシドとしては、タングステン（IV）オキシドおよびタングステン（VI）オキシドが挙げられる。適切なオキソモリブデン錯体としては、モリブデート、モリブデンオキシドおよびモリブデニル錯体が挙げられる。適切なモリブデート錯体としては、モリブデン酸アンモニウムおよびその水和物、モリブデン酸ナト

リウムおよびその水和物、ならびにモリブデン酸カリウムおよびその水和物が挙げられる。適切なモリブデンオキシドとしては、モリブデン(VI)オキシド、モリブデン(VI)オキシドおよびモリブデン酸が挙げられる。適切なモリブデニル錯体としては、例えばモリブデニルアセチルアセトネートが挙げられる。他の適切なタングステン錯体およびモリブデン錯体としては、例えばグリセロール、酒石酸および糖由来のヒドロキソ誘導体が挙げられる。

【0535】

広範な種々の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の状況において利用され得る。代表的な例としては、以下が挙げられる：血小板因子4；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（クイーンクラブ(queen crab)の殻から調製される）(Murataら、Cancer Res. 51: 22~26、1991)；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体(SP-PG)（この化合物の機能は、ステロイド（例えば、エストロゲン）およびクエン酸タモキシフェンの存在によって、増強され得る）；スタウロスポリン；基質代謝の調節因子（例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプロリン、d, L-3, 4-デヒドロプロリン、チアプロリン、
、
-ジピリジル、アミノプロピオニトリルフマレートを含む）；4-プロピル-5-(4-ピリジニル)-2(3H)-オキサゾロン；メトトレキサート；ミトザントロン；ヘパリン；インターフェロン；2マクログロブリン-血清；ChIMP-3(Pavloffら、J. Bio. Chem. 267: 17321~17326、1992)；キモスタチン(Tomkinsonら、Biochem J. 286: 475~480、1992)；シクロデキストリンテトラデカサルフェート；エポネマイシン；カンプトテシン；フマギリン(Ingberら、Nature 348: 555~557、1990)；チオリンゴ酸金ナトリウム(「GST」；MatsubaraおよびZiff、J. Clin. Invest. 79: 1440~1446、1987)；アンチコラゲナーゼ-血清；
2-抗プラスミン(Holmesら、J. Biol. Chem. 262(4): 1659~1664、1987)；ピサントレン(National Cancer Institute)；ロベンザリット二ナトリウム(N-(2)-カルボキシフェニル-4-クロロアントロニル酸(chloroa

nthronilic acid)ニナトリウム、すなわち「CCA」; Takeuchiら、Agents Actions 36:312~316、1992); サリドマイド; Angostaticステロイド; AGM-1470; カルボキシアミノイミダゾール(carboxynaminolimidazole); およびメタロプロテインナーゼインヒビター(例えば、BB94)。

【0536】

(細胞レベルでの疾患)

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

【0537】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置あるいは検出され得る細胞生存の増大に関連するさらなる疾患または状態には、悪性疾患の進行および/または転移ならびに以下のような関連する障害が挙げられるが、これらに限定されない: 白血病(急性白血病(例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病(骨髄芽球性、前骨髄球性

、骨髄単球性、単球性および赤白血病を含む)を含む)ならびに慢性白血病(例えば、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病および慢性リンパ球性白血病)、真性赤血球増加症、リンパ腫(例えば、ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、H鎖病、ならびに固形腫瘍(肉腫および癌腫(例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫(endotheliosarcoma)、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、肝細胞癌腫、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、頸部癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髓芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫(meningioma)、黒色腫、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫)を含むが、これらに限定されない)。

【0538】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストによって処置あるいは検出され得るアポトーシスの増大に関連する疾患には、以下が挙げられる：AIDS；神経変性障害(例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎、小脳変性および脳腫瘍または以前に関連した疾患)；自己免疫障害(例えば、多発性硬化症、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、胆汁性肝硬変、ベーチェット病(Bechet's disease)、クローン病、多発性筋炎、全身性エリテマトーデスおよび免疫関連糸球体腎炎ならびに慢性関節リウマチ)、脊髄形成異常症候群(例えば、再生不良性貧血)、対宿主性移植片病、虚血性傷害(心筋梗塞、発作および再灌流傷害によって生じるようなもの)、肝臓傷害(例えば、肝炎関連肝臓傷害、虚血/再灌流傷害、胆汁うっ滞(cholestosis)(胆管傷害)および肝臓癌)；毒物誘導性肝臓疾患(アルコールによって引き起こされるようなもの)、敗血症性ショック、悪液質ならびに食欲不振。

【0539】

(創傷治癒および上皮細胞増殖)

本発明のなおさらなる局面に従って、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアンタゴニストまたはアゴニストを、治療目的のため、例えば、創傷治癒の目的のために上皮細胞増殖および基底ケラチノサイトを刺激するため、ならびに毛包生成および皮膚創傷の治癒を刺激するために、利用するプロセスが提供される。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含む創傷治癒を刺激する際に臨床的に有用であり得る：外科的創傷、切除の創傷、深い創傷（真皮および表皮の損傷を含む）、眼組織の創傷、歯組織の創傷、口腔創傷、糖尿病性潰瘍、皮膚の潰瘍、肘の潰瘍、動脈の潰瘍、静脈うっ滞潰瘍、熱への曝露または化学物質から生ずる熱傷、および他の異常な創傷治癒状態（例えば、尿毒症、栄養失調、ビタミン欠乏、ならびにステロイド、放射線療法および抗腫瘍性薬物および代謝拮抗物質を用いる全身性処置に関連する合併症。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、皮膚損失後の皮膚の回復を促進するために使用され得る。

【0540】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、創傷床 (wound bed) への皮膚移植片の接着を増大するため、および創傷床からの再上皮形成を刺激するために使用され得る。以下は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストが創傷床への接着を増大するために使用され得る、移植片の型である：自家移植片、人工皮膚、同種移植片 (allograft)、自己植皮片、自己表皮移植片 (autoepidermic graft)、無血管性 (avascular) 移植片、ブレア - ブラウン移植片、骨移植片、胚胎組織移植片、真皮移植片、遅延移植片、皮膚移植片、表皮移植片、筋膜移植片、全層皮膚移植片、異種移植片 (heterologous graft)、異種移植片 (xenograft)、同種移植片 (homologous graft)、増殖性移植片、層板状移植片、網状移植片、粘膜移植片、オリエ - ティールシュ移植片、大網移植

片、パッチの移植片 (patch graft)、茎状移植片、全層移植片 (penetrating graft)、分層植皮片 (split skin graft)、分層植皮片 (thick split graft)。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、皮膚の強度を助長するため、および加齢した皮膚の外見を改善するために使用され得る。

【0541】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、肝細胞増殖、および肺、乳房、膵臓、胃、小腸 (small intestine)、および大腸における上皮細胞増殖における変化を生じると考えられる。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、上皮細胞 (例えば、皮脂細胞 (sebocyte)、毛包、肝細胞、II型肺胞上皮細胞 (type II pneumocyte)、ムチン産生杯細胞、および他の上皮細胞、ならびに皮膚、肺、肝臓、および胃腸管内に含まれるそれらの前駆体) の増殖を促進し得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、内皮細胞、ケラチノサイト、および基底ケラチノサイトの増殖を促進し得る。

【0542】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、照射、化学療法処置またはウイルス感染から生じる腸の毒性の副作用を低減するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、小腸粘膜に対して細胞保護的な (cytoprotective) 効果を有し得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、化学療法およびウイルス感染から生じる粘膜炎 (mucositis) (口潰瘍) の治癒を刺激し得る。

【0543】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはア

ンタゴニストは、熱傷を含む、完全な厚さおよび部分的な厚さの皮膚欠損における皮膚の完全な再生（すなわち、毛包、汗腺、および皮脂腺の再増殖）、乾癬のような他の皮膚欠損の処置においてさらに使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、表皮水疱症（これらの損傷の再上皮形成を促進することによる頻繁な開放性かつ疼痛性の水疱を生じる、下層の真皮への表皮の接着の欠損）を処置するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、胃潰瘍および十二指腸（*d o u d e n a l*）潰瘍を処置し、そして粘膜の内層の癒痕形成ならびに腺の粘膜および十二指腸の粘膜の内層の再生による治癒を、より迅速に補助するために使用され得る。炎症性腸疾患、例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎は、それぞれ、小腸または大腸の粘膜表面の破壊を生じる疾患である。従って、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、粘膜表面の再表面形成（*r e s u r f a c i n g*）を促進して、より迅速な炎症性腸疾患の治癒を補助し、そして炎症性腸疾患の進行を予防するために、使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストを用いる処置は、胃腸管全体の粘液の産生に対して有意な効果を有すると予期され、そして摂取された有害な物質からかまたは外科手術後に、腸粘膜を有害な物質から保護するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたアンタゴニストは、その発現不足に関連する疾患を処置するために使用され得る。

【0544】

さらに、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、種々の病的状態に起因する肺への損傷を予防および治癒するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、急性または慢性の肺損傷を予防または処置するために、肺胞および細気管支（*b r o c h i o l a r*）上皮の増殖および分化を刺激し得、そしてその修復を促進し得る。例えば、肺胞（*a v e o l i*）の進行性の損失を生じる気腫、および細気管支上皮および肺胞の壊死を生じ

る吸入傷害 (inhalation injury) (すなわち、煙の吸入および熱傷から生じる) は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストを使用して、効果的に処置され得る。また、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、II型肺胞上皮細胞の増殖および分化を刺激するために使用され得、これは、未熟な乳児における肺硝子膜症 (例えば、乳児呼吸窮迫症候群および気管支肺異形成症) のような疾患を処置または予防するのを助け得る。

【0545】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、肝細胞の増殖および分化を刺激し得、従って、肝臓の疾患および病状 (例えば、肝硬変により生じる劇症肝不全、ウイルス性肝炎および毒性物質 (すなわち、アセトアミノフェン、四塩化炭素 (carbon tetrachloride)、および当該分野で公知の他の肝臓毒素) により生じる肝臓損傷) を緩和または処置するために用いられ得る。

【0546】

さらに、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、真性糖尿病の発症を処置または予防するために使用され得る。新たにI型糖尿病およびII型糖尿病と診断された患者において、いくらかの島細胞機能が残っている場合、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、その疾患の永続的な発現を、緩和、遅延または予防するように、その島機能を維持するために使用され得る。また、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、島細胞機能を改善または促進するための島細胞移植における補助として使用され得る。

【0547】

(神経学的疾患)

本発明のなおさらなる局面に従って、治療目的のため、例えば、神経学的細胞の増殖および/または分化を刺激するために、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストを利用するためのプロ

セスが提供される。従って、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、神経学的疾患を処置および/または検出するために使用され得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、特定の神経系疾患または障害のマーカ―またはディテクター (d e t e c t o r) として使用され得る。

【 0 5 4 8 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストを用いて処置または検出され得る神経学的疾患の例としては、以下が挙げられる：脳疾患（例えば、母系フェニルケトン尿症のようなフェニルケトン尿症を含む代謝性脳疾患）、ピルビン酸カルボキシラーゼ欠乏症、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠乏症、ヴェルニッケ脳障害、脳水腫、テント下 (i n f r a t e n t o r i a l) 新生物を含む小脳性新生物のような脳新生物、脈絡叢新生物のような脳室新生物、視床下部性新生物、テント上新生物、キャナヴァン病、毛細血管拡張性運動失調のような脊髄小脳性退化を含む小脳性運動失調のような小脳疾患、小脳性共同運動障害、フリードライヒ失調症、マチャド - ジョセフ病、オリブ橋小脳萎縮、テント下新生物のような小脳性新生物、軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症および亜急性硬化性汎脳炎のようなびまん性脳硬化、脳血管障害（例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄およびモヤモヤ病を含む頸動脈疾患）、脳のアミロイド血管症、大脳動脈瘤、大脳無酸素症、大脳動脈硬化症、大脳動静脈奇形、大脳動脈疾患、頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群のような脳塞栓症および血栓症、硬膜上血腫、硬膜下血腫およびクモ膜下出血のような脳出血、脳梗塞形成、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群および椎骨脳底不全 (v e r t e b r o b a s i l a r i n s u f f i c i e n c y) のような脳虚血、多発脳梗塞性痴呆のような血管性痴呆、室周白斑症 (p e r i v e n t r i c u l a r l e u k o m a l a c i a) 、群発性頭痛のような血管性頭痛、偏頭痛、エイズ痴呆複合症のような痴呆症、アルツハイマー病およびクロイツフェルト - ヤーコブ病のような初老期痴呆、アルツハイマー病および進行性核上性麻痺のような老年痴呆、多発脳梗塞性痴呆のような血管性痴呆、軸周囲性脳炎を含む脳炎、流行性脳炎、日本脳炎、セントルイス脳

炎、ダニ媒介脳炎および西ナイル熱のようなウイルス性脳炎、急性播種性脳脊髄炎、ブドウ膜髄膜脳炎症候群、脳炎後パーキンソン病および垂球性硬化性汎脳炎のような髄膜脳炎、室周白斑症のような脳軟化症、點頭痙攣を含む全身てんかんのようなてんかん、アブサンスてんかん (absence epilepsy)、MERRF症候群を含むミオクローヌステんかん、強直・間代てんかん、複雑部分てんかん、前頭葉てんかんおよび側頭葉てんかんのような部分てんかん、外傷後てんかん、持続性部分てんかんのようなてんかん重積持続状態、ハレルフォルデン - シュパッツ症候群、ダンディ - ウォーカー症候群および正常圧水頭症のような水頭症、視床下部性新生物のような視床下部性疾患、大脳マラリア、脱力発作を含むナルコレプシー、延髄ポリオ (bulbar poliomyelitis)、大脳偽腫瘍、レット症候群、ライ症候群、視床疾患、大脳トキソプラズマ症、頭蓋内結核腫およびツェルヴェーガー症候群、エイズ痴呆複合症のような中枢神経系感染、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、ウマの脳脊髄炎のような脳脊髄炎、ベネズエラウマ脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、ビスナ、大脳マラリア、クモ膜炎のような髄膜炎、リンパ球性脈絡髄膜炎を含むウイルス性髄膜炎のような無菌性髄膜炎、ヘモフィルス髄膜炎を含む細菌性髄膜炎、リステリア髄膜炎、ウォーターハウス - フリーデリックセン症候群のような髄膜炎菌性脳脊髄膜炎、肺炎球菌髄膜炎および髄膜結核症、クリプトコックス髄膜炎のような真菌性髄膜炎、硬膜下滲出、ブドウ膜髄膜脳炎症候群のような髄膜脳炎、横行脊髄炎のような脊髄炎、脊髄ろうのような神経梅毒、延髄ポリオおよびポリオ後症候群を含むポリオ、プリオン病 (例えば、クロイツフェルト - ヤーコブ病、ウシの海綿状脳症、ゲルストマン - シュトロイスラー症候群、クールー、スクラピー)、大脳トキソプラズマ症、テント下新生物のような小脳性新生物を含む脳新生物のような中枢神経系新生物、脈絡叢新生物、視床下部性新生物およびテント上新生物のような脳室新生物、髄膜新生物、硬膜外新生物を含む脊髄新生物、キャナヴァン病のような脱髄疾患、副腎脳白質ジストロフィーを含むびまん性大脳硬化症 (diffuse cerebral sclerosis)、軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症のようなびまん性大脳硬化症、アレルギー性脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、進行性多病巣性白質脳症、多発性硬化症、橋中央ミエリ

ン溶解、横行脊髄炎、視神経脊髄炎、スクラピー、脊柱前弯症、慢性疲労症候群、ビスナ、高圧神経質症候群 (High Pressure Nervous Syndrome)、髄膜炎、先天性筋無緊張症のような脊髄疾患、筋萎縮性側索硬化症、ヴェルドニッヒ - ホフマン病のような棘筋萎縮、脊髄圧搾、硬膜外新生物のような脊髄新生物、脊髄空洞症、脊髄ろう、スティッフマン症候群、アンゲルマン症候群のような精神遅滞、ネコ鳴き症候群、ド・ランゲ症候群、ダウン症候群、ガングリオシドーシス G (M1) のようなガングリオシドーシス、ザントホフ病、テイ - サックス病、ハートナップ病、ホモシスチン尿症、ローレンス - ムーン - ビードル症候群、レッシュ - ナイハン症候群、カエデシロップ病、フコース蓄積症のようなムコリピドーシス、ニューロンセロイド脂褐素沈着症、眼脳腎症候群、母系フェニルケトン尿症のようなフェニルケトン尿症、ブラダー - ヴィリ症候群、レット症候群、ルービンスタイン - テービ症候群、結節硬化症、WAGR 症候群、全前脳症のような神経系異常、水無脳症 (hydranencephaly) を含む無脳症のような神経管不全、アルノルト - キアーリ奇形、脳ヘルニア、髄膜瘤、髄膜脊髄瘤、嚢胞性二分脊椎および潜在性二分脊椎のような脊髄癒合不全、シャルコー - マリー病を含む遺伝性の運動および感覚ニューロパシー、遺伝性視覚萎縮症、レフサム病、遺伝性痙性対麻痺、ヴェルドニッヒ - ホフマン病、先天性痛覚脱失症および家族性自律神経障害のような遺伝性感覚および自律神経性ニューロパシー、神経学的症状発現 (例えば、ゲルストマン症候群を含む失認)、逆向性健忘症のような健忘症、失行症、神経因性膀胱、脱力発作、難聴、部分聴覚欠失および大声 (loudness) レクルートメントおよび耳鳴を含む聴覚障害のような情報伝達障害、失書症、名称失語症、プロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む失語症のような言語障害、後天性失読症のような失読症、言語発達障害、名称失語症、プロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む失語症のような発語障害、発音障害、構語障害、反響言語、無言症およびどもりを含む発語障害のような情報伝達障害、失声症および嚔声のような発声障害、除脳硬直状態、せん妄、線維束性攣縮、幻覚、髄膜炎、アンゲルマン症候群、運動失調、アテトーシス、舞蹈病、失調症、運動低下症、筋肉緊張低下、ミオクローヌス、チック、斜頸および振せんのような運動障害、スティッフマ

ン症候群のような筋肉硬直のような筋肉緊張亢進、筋肉痙性、耳帯状疱疹を含む顔面神経麻痺のような麻痺、胃不全麻痺、片麻痺、複視のような眼筋麻痺、デュエーン症候群、ホルナー症候群、キーンズ症候群のような慢性進行性外眼筋麻痺症、球麻痺、熱帯性痙攣対麻痺、ブラウン - セカール症候群、四肢麻痺、呼吸麻痺および声帯麻痺のような対麻痺、不全麻痺、幻肢、無味覚症および味覚不全のような味覚障害、弱視、失明、色覚異常、複視、半盲、視野暗点および準正常視覚 (subnormal vision) のような視覚障害、クライネ - レヴィン症候群、不眠症および夢遊症を含む過眠症のような睡眠障害、開口障害のような痙縮、昏睡、持続性植物状態および失神およびめまいのような意識消失、先天性筋無緊張症のような神経筋疾患、筋萎縮性側索硬化症、ランバート - イートン筋無力症症候群、運動ニューロン疾患、棘筋萎縮、シャルコー - マリー疾患およびヴェルドニッヒ - ホフマン病のような筋萎縮、ポリオ後症候群、筋ジストロフィー、重症筋無力症、萎縮性筋緊張症、先天性筋緊張症 (myotonia congenita)、ネマリンミオパシー、家族性周期性四肢麻痺、多発性パラミクロノス (Multiplex Paramyoclonus)、熱帯性痙攣対麻痺およびスティッフマン症候群、先端肢端疼痛症のような末梢神経系疾患、アミロイドニューロパシー、アーディー症候群、バレー・ニュー症候群、家族性自律神経障害、ホルナー症候群、反射性交感神経性ジストロフィーおよびシャイ - ドレーガー症候群のような自律神経系疾患、神経線維腫症2を含む聴神経腫のような内耳神経疾患のような脳神経疾患、顔面神経痛のような顔面神経疾患、メルカーソン - ローゼンタール症候群、弱視を含む眼球運動性障害、眼振、動眼神経麻痺、デュエーン症候群のような眼筋麻痺、ホルナー症候群、キーンズ症候群を含む慢性進行性外眼筋麻痺症、内斜視および外斜視のような斜視、動眼神経麻痺、遺伝性眼萎縮症を含む眼萎縮症のような眼神経疾患、視神経円板結晶腔、視神経脊髄炎のような視神経炎、乳頭水腫、三叉神経痛、声帯麻痺、視神経脊髄炎および脊柱前弯症のような脱髄疾患、糖尿病性足のよう糖尿病性ニューロパシー、手根管症候群のような神経圧搾症候群、足根管症候群、頸肋症候群のような胸郭出口症候群、尺骨神経圧搾症候群、カウザルギー、頸腕神経痛、顔面神経痛および三叉神経痛のような神経痛、実験的アレルギー性神経炎、視神経炎

、多発性神経炎、多発性神経根神経炎および神経根炎（例えば、多発性神経根炎、遺伝性運動および感覚ニューロパシー（例えば、シャルコー-マリー病、遺伝性眼萎縮症、レフサム病、遺伝性痙性対麻痺およびヴェルドニッヒ ホフマン病、遺伝性感覚および自律神経ニューロパシー（先天性痛覚脱失および家族性自律神経障害を含む）、P O E M S 症候群、坐骨神経痛、味覚性発汗症およびテタニー）のような神経炎）。

【0549】

（感染性疾患）

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストは、感染因子を処置または検出するために用いられ得る。例えば、免疫応答を増加させることによって、特にB細胞および/またはT細胞の増殖および分化を増加させることによって、感染性疾患が処置され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を増加させるか、または新たな免疫応答を開始させるかのいずれかにより上昇され得る。あるいは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびにアゴニストまたはアンタゴニストはまた、必ずしも免疫応答を誘発することなく、感染因子を直接阻害し得る。

【0550】

ウイルスは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストにより処置または検出され得る疾患または症状を引き起こし得る感染因子の一例である。ウイルスの例としては、以下のDNAおよびRNAのウイルスおよびウイルス科が挙げられるがこれらに限定されない：アルボウイルス、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アルテリウイルス、ビルナウイルス科、ブイヤウイルス科、カルシウイルス科、サルコウイルス科(Circoviridae)、コロナウイルス科、デング熱、EBV、HIV、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科(肝炎)、ヘルペスウイルス科(例えば、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、帯状疱疹)、モノネガウイルス(Mononegavirus)(例えば、パラミクソウイルス科、麻疹ウイルス、ラブドウイルス科)、オルソミクソウイルス科(例えば、インフルエンザA、インフルエンザB、およびパラインフルエンザ)、パピローマウイルス、パポバ

ウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科（例えば、痘瘡またはワクシニア）、レオウイルス科（例えば、ロタウイルス）、レトロウイルス科（HTLV-I、HTLV-II、レンチウイルス）、およびトガウイルス科（例えば、ルビウイルス属）。これらの科内に入るウイルスは、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：関節炎、細気管支炎（bronchiolitis）、RSウイルス、脳炎、眼感染症（例えば、結膜炎、角膜炎）、慢性疲労症候群、肝炎（A型、B型、C型、E型、慢性活動性、デルタ）、日本脳炎、フニン、チングニア、リフトバレー熱、黄熱病、髄膜炎、日和見感染症（例えば、AIDS）、肺炎、バーキットリンパ腫、水痘、出血熱、麻疹、流行性耳下腺炎、パラインフルエンザ、狂犬病、感冒、ポリオ、白血病、風疹、性感染症、皮膚病（例えば、カポジ、いぼ）、およびウイルス血症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患が処置または検出され得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、以下の処置に使用される：髄膜炎、デング熱、EBV、および/または肝炎（例えば、B型肝炎）。さらなる特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、1以上の他の市販の肝炎ワクチンに非応答性の患者を処置するために使用される。さらに特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、AIDSを処置するために使用される。

【0551】

同様に、疾患または症状を引き起こし得、かつ本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、ならびに/またはアゴニストまたはアンタゴニストによって処置または検出され得る細菌性因子あるいは真菌性因子は、以下のグラム陰性およびグラム陽性の細菌および細菌科ならびに真菌を含むがこれらに限定されない：Actinomycetales（例えば、Corynebacterium、Mycobacterium、Norcardia）、Cryptococcus neoformans、Aspergillosis、Bacillace

ae (例えば、Anthrax、Clostridium)、Bacteroidaceae、Blastomycosis、Bordetella、Borrelia (例えば、Borrelia burgdorferi)、Brucellosis、Candidiasis、Campylobacter、Coccidioidomycosis、Cryptococcosis、Dermatocycoses、E. coli (例えば、Enterotoxigenic E. coli および Enterohemorrhagic E. coli)、Enterobacteriaceae (Klebsiella、Salmonella (例えば、Salmonella typhi、および Salmonella paratyphi)、Serratia、Yersinia)、Erysipelothrix、Helicobacter、Legionellosis、Leptospirosis、Listeria、Mycoplasmatales、Mycobacterium leprae、Vibrio cholerae、Neisseriaceae (例えば、Acinetobacter、Gonorrhea、Menigococcal)、Neisseria meningitidis、Pasteurellaceaeの感染症 (例えば、Actinobacillus、Haemophilus (例えば、Haemophilus influenza B型)、Pasteurella)、Pseudomonas、Rickettsiaceae、Chlamydiaceae、Syphilis、Shigella spp.、Staphylococcal、Meningococcal、Pneumococcal および Streptococcal (例えば、Streptococcus pneumoniae および B群 Streptococcus)。これらの細菌または真菌の科は、以下を含むがこれらに限定されない疾患または症状を引き起こし得る：菌血症、心内膜炎、眼感染症 (結膜炎、結核、ブドウ膜炎)、歯肉炎、日和見感染症 (例えば、AIDSに関連した感染症)、爪周囲炎、プロテーゼ関連感染症 (prosthesis-related infection)、ライター病、気道感染症 (例えば、百日咳または蓄膿症)、敗血症、ライム病、ネコ引っ掻き病、赤痢、パラチフス熱、食中毒、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎 (例え

ば、髄膜炎A型およびB型)、クラミジア、梅毒、ジフテリア、らい病、パラ結核、結核、狼瘡、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿痂疹、リウマチ熱、猩紅熱、性感染症、皮膚病(例えば、蜂巣炎、皮膚真菌症(*dermatocycoses*))、毒血症、尿路感染症、創傷感染症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、アゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状もしくは疾患を処置または検出し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、以下を処置するために使用される:破傷風、ジフテリア、ボツリヌス、および/またはB型髄膜炎。

【0552】

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

【0553】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくは

はアンタゴニストは、患者に有効量のポリペプチドを投与するか、または患者から細胞を取り出して、本発明のポリヌクレオチドをこの細胞に供給し、そして操作した細胞を患者に戻す（エキソビボ治療）かのいずれかによるものであり得る。さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドはワクチン中の抗原として用いられて、感染性疾患に対する免疫応答を惹起し得る。

【0554】

（再生）

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

【0555】

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

【0556】

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

ssure ulcer)、脈管不全、外科的創傷、および外傷性創傷に関連する潰瘍が挙げられる。

【0557】

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

【0558】

(走化性)

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

【0559】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の細胞の走化性活性を増大し得る。次いで、これらの走化性分子を使用して、身体内の特定の位置に標的化した細胞の数を増加させることによって、炎症、感染、過増殖障害、または任意の免疫系障害を処置し得る。例えば、走化性分子を使用して、傷害を受けた位置に免疫細胞を誘引することによって、組織に対する創傷および他の外傷を処置し得る。本発明の走化性分子

はまた、線維芽細胞を誘引し得、これは創傷を処置するために使用され得る。

【0560】

本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストが走化性活性を阻害し得ることもまた意図される。これらの分子はまた、障害を処置するために使用され得る。従って、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびにアゴニストもしくはアンタゴニストは、走化性のインヒビターとして使用され得る。

【0561】

(結合活性)

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

【0562】

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

【0563】

好ましくは、これらの分子についてのスクリーニングは、このポリペプチドを発現する適切な細胞を産生する工程を包含する。好ましい細胞としては、哺乳動物、酵母、Drosophila、またはE.coli由来の細胞が挙げられる。次いで、このポリペプチドを発現する細胞(または、発現されたポリペプチド

を含む細胞膜)を、好ましくは、このポリペプチドまたはこの分子のいずれかの結合、活性の刺激、または活性の阻害を観察するための分子を潜在的に含む試験化合物と接触させる。

【0564】

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

【0565】

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

【0566】

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

【0567】

さらに、本発明のポリペプチドが結合するレセプターは、当業者に公知の多くの方法(例えば、リガンドパニングおよびFACSソーティング(Coliganら、Current Protocols in Immun., 1(2)、第5章(1991)))によって同定され得る。例えば、ポリアデニル化RNAがこのポリペプチドに応答する細胞から調製される発現クローニングが用いられ、例えば、NIH3T3細胞(これは、FGFファミリータンパク質に対する複数のレセプターを含むことが公知である)、およびSC-3細胞、およびこのRNAから作製されたcDNAライブラリーは、プールに分けられ、そしてこのポ

リペプチドに応答性でないCOS細胞または他の細胞をトランスフェクトするために使用される。ガラススライド上で増殖しているトランスフェクトされた細胞は、それらを標識化した後に、本発明のポリペプチドに曝露される。このポリペプチドは、種々の手段（部位特異的プロテインキナーゼに対する認識部位のヨウ素化または封入を含む）によって標識化され得る。

【0568】

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

【0569】

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

【0570】

さらに、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および/またはコドンシャッフリングの技術（集散的に「DNAシャッフリング」という）を利用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、それによって本発明のポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを効果的に生成する。一般に、米国特許第5,605,793号、同第5,811,238号、同第5,830,721号、同第5,834,252号、および同第5,837,458号、ならびにPatten, P.A.ら、Curr. Opinion Biotechnol. 8:724~33(1997); Harayama, S. Trends Biotechnol. 16(2):76~82(1998

); Hansson, L. O.ら、*J. Mol. Biol.* 287:265~76 (1999); ならびに Lorenzo, M. M. および Blasco, R. *Biotechniques* 24(2):308~13 (1998) (これらの特許および刊行物の各々は、本明細書において参考として援用される) を参照のこと。1つの実施形態において、ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変更は、DNAシャッフリングによって達成され得る。DNAシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的な組換えによる、2つ以上のDNAセグメントの、所望の分子への構築を含む。別の実施形態において、ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドは、組換えの前に、誤りがちな (error-prone) PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発に供することによって、変更され得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドの1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどと組換えられ得る。好ましい実施形態において、この異種分子は、ファミリーのメンバーである。さらに好ましい実施形態において、この異種分子は、例えば、血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF-I)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β 、表皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、TGF- β 、骨形成タンパク質 (BMP)-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、アクチビンAおよびアクチビンB、デカペンタプレジック (decapentaplegic) (dpp)、60A、OP-2、ドーサリン (dorsalin)、増殖分化因子 (GDF)、結節 (nodal)、MIS、インヒビン- β 、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 5、および神経膠由来神経栄養因子 (GDNF) のような増殖因子である。

【0571】

他の好ましいフラグメントは、本発明のポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、本発明のポリペプチドの活性に類似であるが必ずしも同一ではない活性を示す、フラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または減少した所望さ

れない活性を含み得る。

【0572】

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

【0573】

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

【0574】

これらの上記のアッセイの全ては、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。これらのアッセイを用いて発見される分子は、ポリペプチド/分子を活性化または阻害することによって、疾患を処置するか、あるいは患者に特定の結果（例えば、血管増殖）をもたらすために使用され得る。さらに、アッセイ

は、適切に操作された細胞または組織からの本発明のポリペプチドの産生を阻害または増強し得る因子を発見し得る。

【0575】

従って、本発明は、以下の工程を含む本発明のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法を包含する：(a) 候補結合化合物を本発明のポリペプチドとともにインキュベートする工程；および(b) 結合が生じたか否かを決定する工程。さらに、本発明は、以下の工程を含むアゴニスト/アンタゴニストを同定する方法を包含する：(a) 候補化合物を本発明のポリペプチドとともにインキュベートする工程、(b) 生物学的活性をアッセイする工程、および(b) ポリペプチドの生物学的活性が改変されているか否かを決定する工程。

【0576】

(標的化された送達)

別の実施形態において、本発明は、組成物を、本発明のポリペプチドについてのレセプターを発現する標的化細胞、または本発明のポリペプチドの細胞結合形態を発現する細胞に送達する方法を提供する。

【0577】

本明細書中で議論される場合、本発明のポリペプチドまたは抗体は、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素またはプロドラッグと、疎水性、親水性、イオン性および/または共有結合性の相互作用を介して会合し得る。1つの実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合した本発明のポリペプチド(抗体を含む)を投与することによる、本発明の組成物の細胞への特異的な送達のための方法を提供する。1つの例において、本発明は、治療タンパク質を標的化細胞中へ送達するための方法を提供する。別の例において、本発明は、一本鎖核酸(例えば、アンチセンスまたはリボザイム)あるいは二本鎖核酸(例えば、細胞のゲノムに組み込まれ得るか、またはエピソームにて複製し得、そして転写され得る、DNA)を、標的化細胞に送達するための方法を提供する。

【0578】

別の実施形態において、本発明は、毒素または細胞傷害性プロドラッグと会合した本発明のポリペプチド(例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体

)を投与することによる細胞の特異的破壊(例えば、腫瘍細胞の破壊)のための方法を提供する。

【0579】

「毒素」とは、内因性の細胞傷害性エフェクター系、放射性同位体、ホロ毒素(holotoxin)、改変型毒素、毒素の触媒サブユニット、または規定の条件下で細胞死を引き起こす細胞中もしくは細胞表面には通常存在しない任意の分子もしくは酵素を、結合および活性化する化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：当該分野で公知の放射性同位体、固有のまたは誘導された内因性の細胞傷害性エフェクター系を結合する化合物(例えば、抗体(またはその補体固定を含む部分))、チミジンキナーゼ、エンドヌクラーゼ、RNAse、毒素、リシン、アブリン、Pseudomonas外毒素A、ジフテリア毒素、サポリン、モルジン(momordin)、ゲロニン(gelonin)、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、 α -サルシン(sarcin)およびコレラ毒素。

「細胞傷害性プロドラッグ」とは、通常細胞内に存在する酵素によって、細胞傷害性化合物へと変換される非毒性の化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る細胞傷害性プロドラッグとしては、安息香酸マスタードアルキル化剤のグルタミル誘導体、エトポシドまたはマイトマイシンCのリン酸誘導体、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、およびドキソルビシンのフェノキシアセトアミド誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0580】

(薬物スクリーニング)

本発明のポリペプチドの活性を改変する分子についてスクリーニングするための、本発明のポリペプチド、またはこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用が、さらに意図される。このような方法は、本発明のポリペプチドを、アンタゴニスト活性またはアゴニスト活性を有することが疑われる選択された化合物と接触させる工程、および結合に続いてこれらのポリペプチドの活性をアッセイする工程を包含する。

【0581】

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて、本発明のポリペプチド、またはそれらの結合フラグメントを使用することによって治療用化合物をスクリーニングするために特に有用である。このような試験に用いられるポリペプチドまたはフラグメントは、固体支持体に固定化され得、細胞表面上に発現され得、溶液中で遊離であり得、または細胞内に局在化され得る。薬物スクリーニングの1つの方法は、ポリペプチドまたはフラグメントを発現する組換え核酸を用いて安定に形質転換される真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する。薬物は、競合結合アッセイにおいて、このような形質転換細胞に対してスクリーニングされる。例えば、試験されている薬剤と本発明のポリペプチドとの間の複合体の形成 (f o r m u l a t o n) を測定し得る。

【0582】

従って、本発明は、本発明のポリペプチドによって媒介される活性に影響を及ぼす薬物または任意の他の薬剤についてのスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、当該分野で周知の方法によって、このような薬剤を本発明のポリペプチドもしくはそのフラグメントと接触させる工程、およびこの薬剤とこのポリペプチドもしくはそのフラグメントとの間の複合体の存在についてアッセイする工程を包含する。このような競合結合アッセイにおいて、スクリーニングされる薬剤は、代表的に、標識化される。インキュベーション後に、遊離の薬剤は、結合形態で存在する薬剤から分離され、そして遊離または複合体化されていない標識の量は、特定の薬剤が本発明のポリペプチドに結合する能力の尺度である。

【0583】

薬物スクリーニングについての別の技術は、本発明のポリペプチドに対する適切な結合親和性を有する化合物に対するハイスループットスクリーニングを提供し、そして欧州特許出願84/03564(1984年9月13日公開)(これは、本明細書中で参考として援用される)に非常に詳細に記載される。簡潔にいうと、大量の異なる小さなペプチド試験化合物は、固体基材(例えば、プラスチックピンまたは何らかの他の表面)上で合成される。ペプチド試験化合物を、本発明のポリペプチドと反応させ、そして洗浄する。次いで、結合したポリペプチドは、当該分野で周知の方法によって検出される。精製されたポリペプチドは、

前述の薬物スクリーニング技術での使用のためにプレート上に直接コーディングされる。さらに、非中和抗体を使用して、このペプチドを捕捉し得、そして固体支持体上にそれを固定し得る。

【0584】

本発明はまた、競合薬物スクリーニングアッセイの使用を意図し、ここで、本発明のポリペプチドを結合し得る中和抗体は、ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する結合について試験化合物と特異的に競合する。この様式において、抗体を使用して、本発明のポリペプチドと1つ以上の抗原性エピトープを共有する任意のペプチドの存在を検出する。

【0585】

(アンチセンスおよびリボザイム(アンタゴニスト))

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

これらの方法は、相補的なDNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。

【0586】

例えば、非リンパ性白血病細胞株HL-60および他の細胞株の増殖を阻害するためのc-mycおよびc-mybアンチセンスRNA構築物の使用は、以前に記載された(Wickstromら(1988); Anfossiら(1989))。これらの実験は、細胞をオリゴヌクレオチドとインキュベーションすることによってインビトロで行われた。インビボ用途のための類似の手順は、WO91/15580に記載される。簡単には、所定のアンチセンスRNAについてのオリゴヌクレオチドの対は、以下のように生成される：オープンリーディングフレームの最初の15塩基に相補的な配列を、5末端のEcoRI部位および3末端のHindIII部位に隣接させる。次に、オリゴヌクレオチドの対は、90℃で1分間加熱され、次いで2×連結緩衝液(20mM TRIS HCl pH7.5、10mM MgCl₂、10mM ジチオスレイトール(DTT)および0.2mM ATP)中でアニーリングされ、次いで、レトロウイルスベクターPMV7のEcoRI/HindIII部位に連結される(WO91/15580)。

【0587】

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

【0588】

1つの実施形態において、本発明のアンチセンス核酸は、外来の配列からの転写により細胞内で産生される。例えば、ベクターまたはその一部が転写され、本発明のアンチセンス核酸(RNA)を産生する。このようなベクターは、アンチ

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

【0589】

本発明のアンチセンス核酸は、少なくとも本発明の遺伝子のRNA転写物の一部に相補的な配列を含む。しかし、完全に相補的であることは好ましいが、必要ではない。本明細書中で言及される「少なくともRNAの一部に相補的な」配列は、RNAとハイブリダイズし得るに十分な相補性を有し、安定な二重鎖を形成する配列を意味し；従って、二本鎖アンチセンス核酸の場合において、二重鎖DNAの一本鎖が試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、RNAとのより多くの塩基ミスマッチを含み得、これは、安定な二重鎖(または三重鎖の場合もあり得る)をなお形成し得る。当業者は、ハイブリダイズ複合体の融点を決定するために標準的な手順を使用することによりミスマッチの許容の程度を確認し得る。

【0590】

メッセージの5'末端に相補的であるオリゴヌクレオチド(例えば、AUG開始コドンまででかつAUG開始コドンを含む5'非翻訳配列)は、翻訳の阻害の際に最も効率的に働くべきである。しかし、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列は、同様にmRNAの翻訳を阻害する際に有効であることが示された。一般的に、Wagner, R., Nature 372:333-335(1994)を参照のこと。従って、本明細書中に記載されるポリヌクレオチド配列の5'-または3'-の非翻訳非コード領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性mRNAの翻訳を阻害するアンチセンスアプローチに使用され得る。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補物を含むべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳のあまり効率的でないインヒビターであるが、本発明に従って使用され得る。本発明のmRNAの5'領域、3'領域またはコード領域のいずれにハイブリダイズするように設計されるかにかかわらず、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチド長であるべきであり、そして好ましくは6~約50ヌクレオチド長にわたるオリゴヌクレオチドである。特定の局面において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも50ヌクレオチドである。

【0591】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、もしくはRNA、またはキメラ混合物、あるいはそれらの誘導体もしくは改変バージョン、一本鎖、または二本鎖であり得る。このオリゴヌクレオチドは、例えば、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で改変されて、分子の安定性、ハイブリダーゼーションなどを改善し得る。このオリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基(例えば、インビボにおいて宿主細胞レセプターを標的化するために)、または細胞膜を通した輸送を促進する因子(例えば、Letsingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556(1989); Lemaitreら、Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652(1987); PCT公開番号WO88/09810(1988年12月15日公開))

を参照のこと)、または血液脳関門(例えば、PCT公開番号WO89/10134(1988年4月25日公開)を参照のこと)、ハイブリダイゼーション誘引切断剤(hybridization-triggered cleavage agent)(例えば、Krolら、BioTechniques、6:958-976(1988)を参照のこと)、またはインターカレート剤(例えば、Zon, Pharm. Res. 5:539-549(1988)を参照のこと)を含み得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダーゼーション誘引架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘引切断剤など)に結合体化され得る。

【0592】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの改変された塩基部分を含み得、この塩基部分は、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される：5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン(wybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリン。

【0593】

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

【0594】

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

【0595】

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

【0596】

本発明のポリヌクレオチドは当該分野で公知の標準的な方法 (例えば、自動DNA合成機 (このような装置はBiosearch, Applied Biosystemsなどから市販されている) の使用により) により合成され得る。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinらの方法 (Nucl. Acids Res.、16:3209 (1988)) により合成され得、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、コントロールドポアガラス (controlled pore glass) ポリマー支持体 (Sarinら、Pr

oc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85: 7448 - 7451 (1988)) などの使用により調製され得る。

【0597】

コード領域配列に相補的なアンチセンスヌクレオチドが使用され得るが、転写された非翻訳領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドが最も好ましい。

【0598】

本発明による潜在的なアンタゴニストはまた、触媒RNA、すなわちリボザイムを含む(例えば、PCT国際公開WO90/11364、1990年10月4日公開; Sarverら、Science、247: 1222 - 1225 (1990)を参照のこと)。部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムを使用して、mRNAを破壊し得るが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接領域により決定される位置で、mRNAを切断する。たった1つの必要条件は、標的mRNAが以下の2塩基の配列を有することである: 5' - UG - 3'。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および生成は当該分野で周知であり、そしてHaseloffおよびGerlach、Nature、334: 585 - 591 (1988)により十分に記載される。配列番号Xのヌクレオチド配列内に多くの潜在的なハンマーヘッド型リボザイム切断部位が存在する。好ましくは、このリボザイムは、切断認識部位がmRNAの5'末端付近に位置するように; すなわち、効率を増大し、そして非機能的mRNA転写物の細胞内蓄積を最小化するように、操作される。

【0599】

アンチセンスアプローチの場合、本発明のリボザイムは、改変されたオリゴヌクレオチド(例えば、安定性、標的化などを改良するために)から構成され得、そしてインビボにおいて本発明のポリペプチドを発現する細胞に送達されるべきである。リボザイムをコードするDNA構築物は、DNAをコードするアンチセンスの導入に関して上に記載されると同じ様式において細胞中に導入され得る。送達の好ましい方法は、強力な構成性プロモーター(例えば、pol IIIまたはpol IIプロモーターのような)の制御下で、リボザイムを「コードす

る」DNA構築物を使用することを含み、その結果トランスフェクトした細胞が、内因性メッセージを破壊し、そして翻訳を阻害するに十分な量のリボザイムを生成する。リボザイムはアンチセンス分子と異なり触媒性であるので、より低い細胞内濃度が効率のために必要とされる。

【0600】

アンタゴニスト/アゴニスト化合物を利用して、腫瘍性の細胞および組織に対する本発明のポリペプチドの細胞増殖 (growth) および増殖 (proliferation) 効果を阻害し得る。すなわち、腫瘍のアゴニストを刺激し、それにより異常な細胞成長および増殖を (例えば、腫瘍形成または増殖において) 遅延または防止する。

【0601】

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

【0602】

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

【0603】

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

【0604】

従って、本発明は、本発明のポリヌクレオチドの過剰発現に関連する障害または疾患 (本願の全体に渡って列挙される障害または疾患が含まれるが、これらに限定されない) を処置する方法であって、(a) 本発明のポリヌクレオチドに関するアンチセンス分子、および/または (b) 本発明のポリヌクレオチドに関するリボザイムを、患者に投与することによって処置する方法を提供する。発明、および/または (b) 本発明のポリヌクレオチドに関するリボザイム。

【0605】

(他の活性)

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

【0606】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニスト、またはアンタゴニストを、傷害、火傷、手術後組織修復、および瘢痕に起因する創傷の処置にもまた利用し得る。なぜなら、それらは異なる起源の種々の細胞（例えば、線維芽細胞および骨格筋細胞）に対してマイトジェン性であり、それゆえダメージを受けた組織または疾患組織の修復または置換を促進するからである。

【0607】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、ニューロンの成長を刺激し、そして特定のニューロンの障害または神経変性状態（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、およびAIDS関連複合体）において生じるニューロンの損傷を処置および予防するために用いられ得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、軟骨細胞増殖を刺激する能力を有し得、それゆえ、骨および歯周の再形成を増強し、そして組織移植片または骨の移植片における補助のために利用され得る。

【0608】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた利用して、ケラチノサイト増殖を刺激することにより、日焼けに起因する皮膚の老化を予防し得る。

【0609】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニスト

をまた、抜け毛を予防するために利用し得る。なぜなら、FGFファミリーのメンバーは、髪形成細胞を活性化し、そしてメラノサイト増殖を促進するからである。同じ方針で、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストを利用して、他のサイトカインと組み合わせて使用した場合、造血細胞および骨髄細胞の増殖および分化を刺激し得る。

【0610】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた、移植前の器官を維持するためか、または初代組織の細胞培養を支持するために使用し得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、初期胚において分化するように中胚葉起源の組織を誘導するために利用され得る。

【0611】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストはまた、先に議論されるような造血系統に加えて、胚性幹細胞の分化もしくは増殖を増加または減少し得る。

【0612】

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

【0613】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストは、バイオリズム、心臓（cardiac）リズム、うつ病（抑うつ性の障害を含む）、暴力の傾向、痛みへの耐性、生殖能力（好ましくは、アクチビンまたはインヒビン様活性によって）、ホルモンレベルもしくは内分泌レベル、食欲、性欲、記憶、ストレス、または他の認知の質に影響を及ぼすことによって、

哺乳動物の精神状態または身体状態を変更するために使用され得る。

【0614】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストはまた、例えば、貯蔵能力、脂肪含有量、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子、または他の栄養成分を増加または減少させるような食品添加物または保存剤として使用され得る。

【0615】

上記の適用は、広範な種類の宿主における用途を有する。このような宿主としては、ヒト、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ミニブタ(micro-pig)、ニワトリ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、この宿主は、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ニワトリ、ラット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌまたはネコである。好ましい実施形態において、この宿主は哺乳動物である。最も好ましい実施形態において、この宿主はヒトである。

【0616】

(他の好ましい実施形態)

本願発明の他の好ましい実施形態は、配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖および/もしくはcDNAプラスミドZのヌクレオチド配列中の少なくとも約50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を含む。

【0617】

上記連続したヌクレオチドの配列が、表1中の配列番号Xについて同定された位置の範囲で、配列番号Xのヌクレオチド配列に含まれる、核酸分子もまた好ましい。

【0618】

配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖および/もしくはcDNAプラスミドZのヌクレオチド配列中の少なくとも約150個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸

分子もまた好ましい。

【0619】

配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖および/もしくはcDNAプラスミドZのヌクレオチド配列中の少なくとも約500個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子はさらに好ましい。

【0620】

さらに好ましい実施形態は、表1中の配列番号Xについて同定された位置の範囲で配列番号Xのヌクレオチド配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子である。

【0621】

さらに好ましい実施形態は、配列番号Xの完全なヌクレオチド配列またはその相補鎖および/もしくはcDNAプラスミドZのヌクレオチド配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。

【0622】

ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖および/もしくはcDNAプラスミドZのヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする単離された核酸分子もまた好ましく、ここで上記のハイブリダイズする核酸分子は、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、A残基のみまたはT残基のみからなるヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズしない。

【0623】

cDNAプラスミドZを含むDNA分子を含む組成物もまた好ましい。

【0624】

cDNAプラスミドZのヌクレオチド配列中の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子もまた好ましい。

【0625】

上記の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列が、cDNAプラスミド

Zによってコードされるオープンリーディングフレームの配列のヌクレオチド配列中に含まれる、単離された核酸分子もまた好ましい。

【0626】

cDNAプラスミドZによってコードされるヌクレオチド配列中の少なくとも150個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた好ましい。

【0627】

さらに好ましい実施形態は、cDNAプラスミドZによってコードされるヌクレオチド配列中の少なくとも500個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。

【0628】

さらに好ましい実施形態は、cDNAプラスミドZによってコードされる完全なヌクレオチド配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子である。

【0629】

さらに好ましい実施形態は、以下：配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖およびcDNAプラスミドZによりコードされるヌクレオチド配列からなる群から選択される配列中の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を、生物学的サンプルにおいて検出するための方法であって、上記の方法は、上記の群から選択される配列と、上記のサンプル中の少なくとも1つの核酸分子のヌクレオチド配列とを比較する工程、および上記サンプル中の上記核酸分子の配列が、上記の選択された配列に対して少なくとも95%同一であるか否かを決定する工程を包含する。

【0630】

上記の配列を比較する工程が、上記サンプル中の核酸分子と、上記の群から選択される上記の配列を含む核酸分子との間の核酸ハイブリダイゼーションの程度を決定する工程を包含する、上記方法もまた好ましい。同様に、上記の配列を比較する工程が、上記サンプル中の核酸分子から決定されるヌクレオチド配列と、

上記の群から選択される配列とを比較する工程によって実施される、上記方法もまた好ましい。核酸分子は、DNA分子またはRNA分子を含み得る。

【0631】

さらに好ましい実施形態は、生物学的サンプルの種、組織、または細胞型を同定するための方法であって、この方法は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む上記サンプル中の核酸分子を（もしあれば）検出する工程を包含する：配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖、およびcDNAプラスミドZによりコードされるヌクレオチド配列。

【0632】

生物学的サンプルの種、組織、または細胞型を同定するための方法は、少なくとも2つのヌクレオチド配列のパネル中のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出する工程を包含し得、ここで上記パネル中の少なくとも1つの配列は、上記の群から選択される配列中の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一である。

【0633】

タンパク質をコードする、配列番号Xのヌクレオチド配列もしくはその相補鎖またはcDNAプラスミドZのヌクレオチド配列の、異常な構造または発現と関連する病理学的状態を、被験体において診断するための方法もまた好ましく、この方法は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、核酸分子を、（もしあれば）上記被験体から得られる生物学的サンプルにおいて検出する工程を包含する：配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖、およびcDNAプラスミドZのヌクレオチド配列。

【0634】

病理学的状態を診断するための方法は、少なくとも2つのヌクレオチド配列のパネル中のヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出する工程を包含し得、ここで、上記パネル中の少なくとも1つの配列は、上記群から選択される配列中の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一である。

【0635】

上記の核酸分子のヌクレオチド配列が、少なくとも2つのヌクレオチド配列のパネルを含む、単離された核酸分子を含む組成物もまた好ましく、ここで上記のパネル中の少なくとも1つの配列は、以下からなる群から選択される配列中の少なくとも50個連続したヌクレオチドの配列と少なくとも95%同一である：配列番号Xのヌクレオチド配列またはその相補鎖、およびcDNAプラスミドZによりコードされるヌクレオチド配列。この核酸分子は、DNA分子またはRNA分子を含み得る。

【0636】

配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよび/またはcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチド中の少なくとも約10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた好ましい。

【0637】

配列番号Yのアミノ酸配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列および/またはcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約30個連続したアミノ酸の配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた好ましい。

【0638】

配列番号Yのアミノ酸配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列および/またはcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約100個連続したアミノ酸の配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【0639】

配列番号Yの完全アミノ酸配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドの完全アミノ酸配列および/またはcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチドの完全アミノ酸配列と少なくとも95%同一のア

ミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【0640】

cDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチドの完全アミノ酸配列中の少なくとも約10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドはさらに好ましい。

【0641】

上記の連続したアミノ酸の配列が、cDNAプラスミドZによってコードされるポリペプチド；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよび/または配列番号Yのポリペプチド配列の一部のアミノ酸配列に含まれる、ポリペプチドもまた好ましい。

【0642】

cDNAプラスミドZによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約30個連続したアミノ酸の配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【0643】

cDNAプラスミドZによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列中の少なくとも約100個連続したアミノ酸の配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【0644】

cDNAプラスミドZによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【0645】

以下からなる群から選択される配列中の、少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して特異的に結合する単離された抗体は、さらに好ましい：配列番号Yのポリペプチド；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチド配列、およびcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチド。

【0646】

以下：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチド、およびcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチドからなる群から選択された配列中の、少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを、生物学的サンプルにおいて検出する方法はさらに好ましく；この方法は、このサンプル中における少なくとも1つのポリペプチド分子のアミノ酸配列をこの群から選択された配列と比較する工程、およびこのサンプル中におけるこのポリペプチド分子の配列が、少なくとも10個連続したアミノ酸のこの配列と少なくとも90%同一であるかどうかを決定する工程を含む。

【0647】

このサンプル中における少なくとも1つのポリペプチド分子のアミノ酸配列を、この群から選択された配列と比較するこの工程が、このサンプル中のポリペプチドの、以下：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチド、およびcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチドからなる群から選択された配列中の少なくとも10個連続したアミノ酸の配列に対して、少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合する抗体に対する特異的な結合の程度を決定することを含む、上記の方法もまた、好ましい。

【0648】

配列を比較する工程が、このサンプル中のポリペプチド分子から決定されたアミノ酸配列を、この群から選択されたこの配列と比較することによって行われる、上記の方法もまた好ましい。

【0649】

生物学的サンプルの種、組織または細胞型を同定する方法もまた好ましく、ここでこの方法は、もし存在するならば、以下からなる群から選択される配列における少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子をこのサンプル中で検出する工程を含む：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチドおよびcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチド。

【0650】

生物学的サンプルの種、組織または細胞型を同定する上記の方法もまた好ましく、ここでこの方法は、少なくとも2つのアミノ酸配列のパネルにおけるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子を検出する工程を含み、ここでこのパネル中の少なくとも1つの配列は、上記の群から選択された配列における少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一である。

【0651】

被験体において、表1において同定された、ポリペプチドをコードする核酸配列の異常な構造または発現に関連する病的状態を診断する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、この被験体から得られた生物学的サンプルにおいて、少なくとも2つのアミノ酸配列のパネルにおけるアミノ酸配列を含むポリペプチド分子を検出する工程を含み、ここでこのパネル中の少なくとも1つの配列は、以下からなる群から選択される配列における少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一である：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチド、およびcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチド。

【0652】

これらの方法のいずれかにおいて、上記ポリペプチド分子を検出する工程は、抗体を使用することを包含する。

【0653】

以下からなる群から選択された配列中の、少なくとも10個連続したアミノ酸の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子もまた、好ましい：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチド、およびcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチド。

【0654】

上記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、原核生物宿主でのこのポリペプチドの発現について最適化されている、単離された核酸分子もまた、好ま

しい。

【0655】

上記ポリペプチドが以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離された核酸分子もまた、好ましい：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチド、およびcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチド。

【0656】

上記の単離された核酸分子のいずれかをベクター中に挿入する工程を含む、組換えベクターの作製方法はさらに好ましい。この方法によって生成された組換えベクターも、好ましい。宿主細胞中にベクターを導入する工程を含む、組換え宿主細胞を作製する方法、ならびにこの方法によって生成された組換え宿主細胞もまた、好ましい。

【0657】

単離されたポリペプチドを作製する方法であって、このポリペプチドが発現されるような条件下でこの組換え宿主細胞を培養する工程、およびこのポリペプチドを回収する工程を包含する、方法もまた好ましい。この組換え宿主細胞が真核生物細胞であり、そしてこのポリペプチドが以下からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むヒトタンパク質である、単離されたポリペプチドを作製するこの方法もまた好ましい：配列番号Yのポリペプチド配列；配列番号Xもしくはその相補鎖によりコードされるポリペプチド、およびcDNAプラスミドZによりコードされるポリペプチド。この方法によって生成された単離されたポリペプチドもまた、好ましい。

【0658】

増加したレベルのタンパク質活性を必要とする個体を処置する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、このような個体に、この個体においてこのタンパク質の活性のレベルを増加させるのに有効な量の、本願発明の単離されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、その免疫原性フラグメントもしくはアナログ、結合因子、抗体、あるいは抗原フラグメントを含む治療剤を投与する工程を包含する。

。

【0659】

減少したレベルのタンパク質活性を必要とする個体を処置する方法もまた、好ましく、ここで、この方法は、このような個体に、この個体においてこのタンパク質の活性のレベルを減少させるのに有効な量の、本願発明の単離されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、その免疫原性フラグメントもしくはアナログ、結合因子、抗体、あるいは抗原フラグメントを含む治療剤を投与する工程を包含する。

【0660】

本発明の特定の実施形態では、表2の4番目の列に列挙される各「コンティグID」について、好ましくは、表2の5番目の列で参照されるヌクレオチド配列、および一般式 a - b により記載されるヌクレオチド配列（ここで a および b は、表2の列3で参照される対応する配列番号 X について独自に決定される）を含むか、またはそのようなヌクレオチド配列からなる、1つ以上のポリヌクレオチドが除外される。さらに特定の実施形態は、表2の5番目の列において参照される特定のポリヌクレオチド配列の1、2、3、4個、またはそれ以上を除外するポリヌクレオチド配列に関する。この表は、この一般式により除外され得る配列の全てを含むことを決して意味せず、この表は、単に例示的な例である。これらの登録を通じて利用可能な全ての文献は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

【0661】

【表2】

遺伝子 番号	cDNA クローン ID	776株 配列 番号 X	登録 ID	公開登録番号
1	HRACW30	2	884217	
2	HTPFG82	3	889399	
3	HOFNK31	4	880466	
4	HHPEK94	5	891154	AA156817, AA156897, AA464691, AA424767, AA424901, AA492487, AA524307, AA557417, AA558999, AA729535, AA746965, AA649766, AA405869, AA436613, AA405746, AA923317, AI042516, AI074638, AI079347, AI097311, AI339241, AI127141, AI141600, AI142582, AI142828, AI288884
5	HFIYV36	6	885323	
6	HNGCM03	7	889413	

【0662】

【表3】

70-7 ID	ライブラリコード
番号	
HRACW30	H0004 H0014 H0015 H0025 H0037 H0039 H0040 H0042 H0045 H0050 H0054 H0059 H0063 H0068 H0085 H0086 H0087 H0090 H0101 H0108 H0111 H0113 H0120 H0125 H0134 H0156 H0186 H0188 H0204 H0214 H0231 H0232 H0234 H0235 H0251 H0252 H0254 H0255 H0264 H0271 H0272 H0274 H0343 H0350 H0352 H0375 H0376 H0383 H0396 H0421 H0427 H0444 H0445 H0477 H0478 H0485 H0486 H0487 H0488 H0489 H0506 H0510 H0517 H0538 H0549 H0555 H0575 H0576 H0579 H0581 H0583 H0590 H0591 H0595 H0596 H0597 H0619 H0622 H0634 H0635 H0641 H0646 H0647 H0650 H0652 H0656 H0657 H0658 H0659
	H0662 H0663 H0664 H0666 H0671 H0672 H0676 H0677 H0684 L0021 L0369 L0372 L0375 L0376 L0378 L0379 L0384 L0387 L0499 L0517 L0518 L0523 L0526 L0527 L0529 L0535 L0536 L0538 L0542 L0546 L0547 L0581 L0599 L0600 L0607 L0627 L0633 L0646 L0648 L0655 L0657 L0659 L0662 L0663 L0664 L0665 L0666 L0743 L0744 L0747 L0748 L0751 L0754 L0755 L0758 L0760 L0762 L0763 L0764 L0765 L0766 L0767 L0768 L0770 L0773 L0774 L0775 L0776 L0777 L0779 L0780 L0783 L0785 L0806 L0808 S0011 S0116 S0182 S0322 S0326 S0328 S0330 S0350 S0352 S0354 S0356 S0358 S0360 S0370 S0372 S0374 S0376 S0378 S0380 S0382 S0384 S0394 S0404 S0406 S0408 S0430 S0432 S0434 S0442 S0444 S0446 S0456 S0458 S0462 S0464 S0472 T0004 T0023 T0071
HTPFG82	H0039 H0253 H0264
HOFNK31	H0415
HHPEK94	H0013 H0039 H0040 H0046 H0050 H0090 H0102 H0123 H0144 H0163 H0244 H0328 H0431 H0445 H0486 H0506 H0521 H0522 H0580 H0591 H0599 H0600 H0619 H0622 H0624 H0632 H0646 H0647 H0648 H0658 H0660 H0684 H0688 H0690 L0520 L0640 L0649 L0659 L0662 L0666 L0731 L0747 L0751 L0759 L0763 L0764 L0768 L0777 L0779 L0780 L0793 L0806 S0002 S0011 S0116 S0150 S0250 S0328 S0344 S0356 S0358 S0360 S0376 T0042
HNGCM03	L0361 L0592 L0748 S0052

【0663】

【表4】

配列番号	細胞学的バンド	OMIM I.D.:
2	2p12	147200 178640 216900

【0664】

【表5】

ライブラリー コード	ライブラリーの説明
H0004	Human Adult Spleen
H0013	Human 8 Week Whole Embryo
H0014	Human Gall Bladder
H0015	Human Gall Bladder, fraction II
H0025	Human Adult Lymph Node
H0037	Human Adult Small Intestine
H0039	Human Pancreas Tumor
H0040	Human Testes Tumor
H0042	Human Adult Pulmonary
H0045	Human Esophagus, Cancer
H0046	Human Endometrial Tumor
H0050	Human Fetal Heart
H0054	Human Corpus Colosum
H0059	Human Uterine Cancer

(表5の77頁)

H0063	Human Thymus
H0068	Human Skin Tumor
H0085	Human Colon
H0086	Human epithelioid sarcoma
H0087	Human Thymus
H0090	Human T-Cell Lymphoma
H0101	Human 7 Weeks Old Embryo, subtracted
H0102	Human Whole 6 Week Old Embryo (II), subt
H0108	Human Adult Lymph Node, subtracted
H0111	Human Placenta, subtracted
H0113	Human skin Tumor, subtracted
H0120	Human Adult Spleen, subtracted
H0123	Human Fetal Dura Mater
H0125	Cem cells cyclohexamide treated
H0134	Raji Cells, cyclohexamide treated
H0144	Nine Week Old Early Stage Human
H0156	Human Adrenal Gland Tumor
H0163	Human Synovium
H0186	Activated T-Cell
H0188	Human Normal Breast
H0204	Human Colon Cancer, subtracted
H0214	Raji cells, cyclohexamide treated, subtracted
H0231	Human Colon, subtraction
H0232	Human Colon, differential expression
H0234	human colon cancer, metastatic to liver, differentially expressed
H0235	Human colon cancer, metaticized to liver, subtraction
H0244	Human 8 Week Whole Embryo, subtracted
H0251	Human Chondrosarcoma
H0252	Human Osteosarcoma
H0253	Human adult testis, large inserts
H0254	Breast Lymph node cDNA library
H0255	breast lymph node CDNA library
H0264	human tonsils
H0271	Human Neutrophil, Activated
H0272	HUMAN TONSILS, FRACTION 2
H0274	Human Adult Spleen, fractionII
H0328	human ovarian cancer
H0343	stomach cancer (human)
H0350	Human Fetal Liver, mixed 10 & 14 week
H0352	wilm's tumor
H0375	Human Lung
H0376	Human Spleen
H0383	Human Prostate BPH, re-excision

(表5a77)

H0396	L1 Cell line
H0415	H. Ovarian Tumor, II, OV5232
H0421	Human Bone Marrow, re-excision
H0427	Human Adipose
H0431	H. Kidney Medulla, re-excision
H0444	Spleen metastatic melanoma
H0445	Spleen, Chronic lymphocytic leukemia
H0477	Human Tonsil, Lib 3
H0478	Salivary Gland, Lib 2
H0485	Hodgkin's Lymphoma I
H0486	Hodgkin's Lymphoma II
H0487	Human Tonsils, lib I
H0488	Human Tonsils, Lib 2
H0489	Crohn's Disease
H0506	Ulcerative Colitis
H0510	Human Liver, normal
H0517	Nasal polyps
H0521	Primary Dendritic Cells, lib 1
H0522	Primary Dendritic cells, frac 2
H0538	Merkel Cells
H0549	H. Epididymus, caput & corpus
H0555	Rejected Kidney, lib 4
H0575	Human Adult Pulmonary, re-excision
H0576	Resting T-Cell, re-excision
H0579	Pericardium
H0580	Dendritic cells, pooled
H0581	Human Bone Marrow, treated
H0583	B Cell lymphoma
H0590	Human adult small intestine, re-excision
H0591	Human T-cell lymphoma, re-excision
H0595	Stomach cancer (human), re-excision
H0596	Human Colon Cancer, re-excision
H0597	Human Colon, re-excision
H0599	Human Adult Heart, re-excision
H0600	Healing Abdomen wound, 70&90 min post incision
H0619	Fetal Heart
H0622	Human Pancreas Tumor, Reexcision
H0624	12 Week Early Stage Human II, Reexcision
H0632	Hepatocellular Tumor, re-excision
H0634	Human Testes Tumor, re-excision
H0635	Human Activated T-Cells, re-excision
H0641	LPS activated derived dendritic cells
H0646	Lung, Cancer (4005313 A3): Invasive Poorly Differentiated Lung Adenocarcinoma,

(表5の77キ)

H0647	Lung, Cancer (4005163 B7): Invasive, Poorly Diff. Adenocarcinoma, Metastatic
H0648	Ovary, Cancer: (4004562 B6) Papillary Serous Cystic Neoplasm, Low Malignant Pot
H0650	B-Cells
H0652	Lung, Normal: (4005313 B1)
H0656	B-cells (unstimulated)
H0657	B-cells (stimulated)
H0658	Ovary, Cancer (9809C332): Poorly differentiated adenocarcinoma
H0659	Ovary, Cancer (15395A1F): Grade II Papillary Carcinoma
H0660	Ovary, Cancer: (15799A1F) Poorly differentiated carcinoma
H0662	Breast, Normal: (4005522B2)
H0663	Breast, Cancer: (4005522 A2)
H0664	Breast, Cancer: (9806C012R)
H0666	Ovary, Cancer: (4004332 A2)
H0671	Breast, Cancer: (9802C02OE)
H0672	Ovary, Cancer: (4004576 A8)
H0676	Colon, Cancer: (9808C064R)-total RNA
H0677	TNFR degenerate oligo
H0684	Ovarian cancer, Serous Papillary Adenocarcinoma
H0688	Human Ovarian Cancer(#9807G017)
H0690	Ovarian Cancer, # 9702G001
L0021	Human adult (K.Okubo)
L0361	Stratagene ovary (#937217)
L0369	NCI CGAP AA1
L0372	NCI CGAP Co12
L0375	NCI CGAP Kid6
L0376	NCI CGAP Lar1
L0378	NCI CGAP Lu1
L0379	NCI CGAP Lym3
L0384	NCI CGAP Pr23
L0387	NCI CGAP GCB0
L0499	NCI CGAP HSC2
L0517	NCI CGAP Pr1
L0518	NCI CGAP Pr2
L0520	NCI CGAP Alv1
L0523	NCI CGAP Lip2
L0526	NCI CGAP Pr12
L0527	NCI CGAP Ov2
L0529	NCI CGAP Pr6
L0535	NCI CGAP Br5

(表5のつぎ)

L0536	NCI CGAP Br4
L0538	NCI CGAP Ov5
L0542	NCI CGAP Pr11
L0546	NCI CGAP Pr18
L0547	NCI CGAP Pr16
L0581	Stratagene liver (#937224)
L0592	Stratagene hNT neuron (#937233)
L0599	Stratagene lung (#937210)
L0600	Weizmann Olfactory Epithelium
L0607	NCI CGAP Lym6
L0627	NCI CGAP Co1
L0633	NCI CGAP Lu6
L0640	NCI CGAP Br18
L0646	NCI CGAP Co14
L0648	NCI CGAP Eso2
L0649	NCI CGAP GUI
L0655	NCI CGAP Lym12
L0657	NCI CGAP Ov23
L0659	NCI CGAP Pan1
L0662	NCI CGAP Gas4
L0663	NCI CGAP Ut2
L0664	NCI CGAP Ut3
L0665	NCI CGAP Ut4
L0666	NCI CGAP Ut1
L0731	Soares pregnant uterus NbHPU
L0743	Soares breast 2NbHBst
L0744	Soares breast 3NbHBst
L0747	Soares fetal heart NbHH19W
L0748	Soares fetal liver spleen 1NFLS
L0751	Soares ovary tumor NbHOT
L0754	Soares placenta Nb2HP
L0755	Soares placenta 8to9weeks 2NbHP8to9W
L0758	Soares testis NHT
L0759	Soares total fetus Nb2HF8 9w
L0760	Barstead aorta HPLRB3
L0762	NCI CGAP Br1.1
L0763	NCI CGAP Br2
L0764	NCI CGAP Co3
L0765	NCI CGAP Co4
L0766	NCI CGAP GCB1
L0767	NCI CGAP GC3
L0768	NCI CGAP GC4
L0770	NCI CGAP Brn23
L0773	NCI CGAP Co9
L0774	NCI CGAP Kid3

(表5の77キ)

L0775	NCI CGAP Kid5
L0776	NCI CGAP Lu5
L0777	Soares NhHMPu S1
L0779	Soares NFL T GBC S1
L0780	Soares NSF F8 9W OT PA P S1
L0783	NCI CGAP Pr22
L0785	Barstead spleen HPLRB2
L0793	NCI CGAP Sub7
L0806	NCI CGAP Lu19
L0808	Barstead prostate BPH HPLRB4 1
S0002	Monocyte activated
S0011	STROMAL -OSTEOCLASTOMA
S0052	neutrophils control
S0116	Bone marrow
S0150	LNCAP prostate cell line
S0182	Human B Cell 8866
S0250	Human Osteoblasts II
S0322	Siebben Polyposis
S0326	Mammary Gland
S0328	Palate carcinoma
S0330	Palate normal
S0344	Macrophage-oxLDL, re-excision
S0350	Pharynx Carcinoma
S0352	Larynx Carcinoma
S0354	Colon Normal II
S0356	Colon Carcinoma
S0358	Colon Normal III
S0360	Colon Tumor II
S0370	Larynx carcinoma II
S0372	Larynx carcinoma III
S0374	Normal colon
S0376	Colon Tumor
S0378	Pancreas normal PCA4 No
S0380	Pancreas Tumor PCA4 Tu
S0382	Larynx carcinoma IV
S0384	Tongue carcinoma
S0394	Stomach, normal
S0404	Rectum normal
S0406	Rectum tumour
S0408	Colon, normal
S0430	Aryepiglottis Normal
S0432	Sinus piniformis Tumour
S0434	Stomach Normal
S0442	Colon Normal
S0444	Colon Tumor

(表5のつぎ)

S0446	Tongue Tumour
S0456	Tongue Normal
S0458	Thyroid Normal (SDCA2 No)
S0462	Thyroid Thyroiditis
S0464	Larynx Normal
S0472	Lung Mesothelium
T0004	Human White Fat
T0023	Human Pancreatic Carcinoma
T0042	Jurkat T-Cell, S phase
T0071	Human Bone Marrow

【0665】

【表6】

OMIM ID	OMIM 疾患名
147200	[Kappa light chain deficiency] (3)
178640	Pulmonary alveolar proteinosis, congenital, 265120 (3)
216900	Achromatopsia (2)

概して、本発明を記載してきたが、例示の目的のために提供されそして限定することを意図しない、以下の実施例を参照することによって、本発明はより容易に理解される。

【0666】

(実施例)

(実施例1：選択されたcDNAクローンの寄託されたサンプルからの単離)

引用されるATCC寄託物中の各cDNAクローンは、プラスミドベクター中に含まれる。表1は、各クローンが単離されたcDNAライブラリーを構築するために用いられたベクターを示す。多くの場合において、ライブラリーを構築するために使用されたベクターは、プラスミドが切り出されたファージベクターである。直下の表は、cDNAライブラリーを構築する際に使用される各ファージベクターについて関連するプラスミドを相関づける。例えば、特定のクローンがベクター「Lambda Zap」中に単離されていると表1に示される場合、対応する寄託クローンは、「pBluescript」である。

【0667】

【表7】

<u>構成ライブラリーに 使用したベクター</u>	<u>対応する寄託された プラスミド</u>
Lambda Zap	pBluescript (pBS)
Uni-Zap XR	pBluescript (pBS)
Zap Express	pBK
lafmid BA	plafmid BA
pSport1	pSport1
pCMVSPORT 2.0	pCMVSPORT 2.0
pCMVSPORT 3.0	pCMVSPORT 3.0
pCR [®] 2.1	pCR [®] 2.1

ベクター Lambda Zap (米国特許第5,128,256号および同第5,286,636号)、Uni-Zap XR (米国特許第5,128,256号および同第5,286,636号)、Zap Express (米国特許第5,128,256号および同第5,286,636号)、pBluescript (pBS) (Shortら、Nucleic Acids Res. 16:7583-7600(1988); Alting-Meesら、Nucleic Acids Res. 17:9494(1989))ならびにpBK (Alting-Meesら、Strategies 5:58-61(1992))は、Stratagene Cloning Systems, Inc.、11011 N. Torrey Pines Road、La Jolla, CA, 92037から市販されている。pBSは、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてpBKはネオマイシン耐性遺伝子を含む。両方とも、E. coli株XL-1 Blue (これもまた、Stratageneから入手可能である)に形質転換され得る。pBSは、SK+、SK-、KS+およびKSの4形態で入荷する。SおよびKとは、ポリリンカー領域(「S」とはSacIであり、そして「K」とは、KpnIのことであり、これらは、それぞれのリンカーの各末端で

の最初の部位である)に隣接するT7およびT3プライマー配列に対するポリリンカーの配向をいう。「+」または「-」とは、ある方向においてf1 oriから開始される一本鎖レスキューがセンス鎖DNAを生成し、そして他方においてアンチセンスであるようなf1複製起点(f1 ori)の配向をいう。

【0668】

ベクターpSport1、pCMV Sport 2.0およびpCMV Sport3.0をLife Technologies、Inc.、P.O.Box 6009、Gaithersburg, MD 20897から入手した。全てのSportベクターはアンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてE. coli株DH10B(これもまた、Life Technologiesから入手可能である)に形質転換され得る。(例えば、Gruber, C.E.ら、Focus 15:59(1993)を参照のこと)。ベクターlafmid BA(Bento Soares、Columbia University、NY)は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてE. coli株XL-1 Blueに形質転換され得る。ベクターpCR(登録商標)2.1(これはInvitrogen、1600 Faraday Avenue、Carlsbad、CA 92008から入手可能である)は、アンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてE. coli株DH10B(Life Technologiesから入手可能である)に形質転換され得る(例えば、Clark、Nuc. Acids Res. 16:9677-9686(1988)およびMeadら、Bio/Technology 9:(1991)を参照のこと)。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、表1における特定のクローンについて同定されたファージベクター配列、ならびに上記に示された対応するプラスミドベクター配列を含まない。

【0669】

表1に引用される、任意の所定のcDNAクローンについてATCC受託番号を与えられたサンプルにおける寄託された物質はまた、1つ以上のさらなるプラスミド(これは各々、その所定のクローンとは異なるcDNAクローンを含む)を含み得る。従って、同じATCC受託番号を共有する寄託物は、表1に示される各cDNAクローンのためのプラスミドを少なくとも含む。代表的には、表1

に引用される各ATCC寄託物のサンプルは、ほぼ等量（重量で）の約50個のプラスミドDNA（これは各々、異なるcDNAクローンを含む）の混合物を含む；しかし、このような寄託サンプルは、50個よりも多いかまたは少ないcDNAクローン（約500個までのcDNAクローン）のためのプラスミドを含み得る。

【0670】

表1における特定のクローンについて引用されるプラスミドDNAの寄託サンプルからそのクローンを単離するために2つのアプローチが使用され得る。第一に、プラスミドを、配列番号Xに対応するポリヌクレオチドプローブを使用して、クローンをスクリーニングすることによって直接単離する。

【0671】

特に、30～40ヌクレオチドを有する特定のポリヌクレオチドを、報告されている配列に従って、Applied BiosystemsのDNA合成装置を使用して合成する。オリゴヌクレオチドを、例えば、 ^{32}P -ATPで、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて標識し、そして慣用の方法に従って精製する。（例えば、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring、NY（1982））。プラスミド混合物を、当業者に公知の技術（例えば、ベクター供給者によって提供される技術または上記で引用された関連の刊行物もしくは特許において提供される技術）を用いて、上記のような適切な宿主（例えば、XL-1 Blue（Stratagene））に形質転換する。形質転換体を1.5%寒天プレート（適切な選択薬剤、例えば、アンピシリンを含む）に、1プレートあたり約150の形質転換体（コロニー）の密度でプレーティングする。これらのプレートを、細菌コロニースクリーニングについての慣用の方法（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、（1989）、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1.93～1.104頁）または当業者に公知の他の技術に従って、ナイロンメンブレンを使用してスクリーニングする。

【0672】

あるいは、配列番号Xの両端(すなわち、表1に規定されるクローンの5'NTおよび3'NTによって囲まれる配列番号Xの領域内)に由来する、17~20ヌクレオチドの2つのプライマーを合成し、そしてこれらを使用して、寄託されたcDNAプラスミドをテンプレートとして使用して、所望のcDNAを増幅する。ポリメラーゼ連鎖反応を、慣用の条件下で、例えば、0.5µgの上記cDNAテンプレートとの反応混合物の25µl中で実施する。便利な反応混合物は、1.5~5mM MgCl₂、0.01%(w/v)ゼラチン、それぞれ20µMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、25pmolの各プライマーおよび0.25ユニットのTaqポリメラーゼである。35サイクルのPCR(94 での変性を1分間; 55 でのアニールを1分間; 72 での伸長を1分間)を、Perkin-Elmer Cetus自動化サーマルサイクラーを用いて実施する。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、そして予想される分子量のDNAバンドを切り出し、そして精製する。PCR産物を、DNA産物をサブクローニングおよび配列決定することによって選択された配列であることを確認する。

【0673】

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

【0674】

簡潔には、特定のRNAオリゴヌクレオチドを、全長遺伝子RNA転写物をおそらく含むRNAの集団の5'末端に連結する。連結されたRNAオリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の公知の配列に特異的なプライ

マーを含むプライマーセットを使用して、所望の全長遺伝子の5'部分をPCR増幅する。次いで、この増幅した産物を配列決定し得、そしてこれを使用して全長遺伝子を生成し得る。

【0675】

この上記の方法は、所望の供給源から単離された総RNAを用いて開始するが、ポリA+RNAをも使用し得る。次いで、RNA調製物を、必要ならばホスファターゼで処理して、後のRNAリガーゼ工程を妨害し得る分解または損傷RNAの5'リン酸基を排除し得る。次いで、ホスファターゼを不活化するべきであり、そしてRNAをメッセンジャーRNAの5'末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼを用いて処理するべきである。この反応は、次いでT4 RNAリガーゼを用いてRNAオリゴヌクレオチドに連結され得る、キャップ切断RNAの5'末端に5'リン酸基を残す。

【0676】

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

【0677】

(実施例2：ポリヌクレオチドに対応するゲノムクローンの単離)

ヒトゲノムP1ライブラリー(Genomic Systems, Inc.)を、実施例1に記載される方法に従って、配列番号Xに対応するcDNA配列について選択されたプライマーを用いるPCRによってスクリーニングする(Sambrookもまた参照のこと)。

【0678】

(実施例3：ポリペプチドの組織分布)

本発明のポリヌクレオチドのmRNA発現の組織分布を、とりわけ、Sambrookらによって記載されるノーザンプロット分析についてのプロトコルを用

いて決定する。例えば、実施例1に記載される方法によって生成されるcDNAプローブを、rediprime™ DNA labeling system (Amersham Life Science)を用いて、製造者の指示に従って、P³²で標識する。標識後、プローブを、CHROMA SPIN-100™カラム(Clontech Laboratories, Inc.)を使用して、製造者のプロトコル番号PT1200-1に従って精製する。次いで、精製した標識プローブを使用して、種々のヒト組織をmRNA発現について試験する。

【0679】

種々のヒト組織(H)またはヒト免疫系組織(IM)を含む多重組織ノーザン(MTN)プロット(Clontech)を、ExpressHyb™ハイブリダイゼーション溶液(Clontech)を用いて、製造者のプロトコル番号PT1190-1に従って、標識プローブで試験する。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、プロットをマウントして、そして-70℃で一晩フィルムに露出し、そしてフィルムを標準的な手順に従って現像する。

【0680】

(実施例4：ポリヌクレオチドの染色体マッピング)

オリゴヌクレオチドプライマーのセットを、配列番号Xの5'末端の配列に従って設計する。このプライマーは、好ましくは約100ヌクレオチドにわたる。次いで、このプライマーセットを、以下のセットの条件下でポリメラーゼ連鎖反応に使用する：95℃で30秒；56℃で1分；70℃で1分。このサイクルを32回反復し、次いで1回、70℃で5分間のサイクルを行う。個々の染色体または染色体フラグメントを含む体細胞ハイブリッドパネル(Bios, Inc)に加えて、ヒト、マウス、およびハムスターのDNAを鋳型として使用する。反応物を、8%ポリアクリルアミドゲルまたは3.5%アガロースゲルのいずれかで分析する。染色体マッピングを、特定の体細胞ハイブリッドにおける約100bpのPCRフラグメントの存在によって決定する。

【0681】

(実施例5：ポリペプチドの細菌性発現)

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、実施例1に概説するように、DNA配列の5'および3'末端に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅して挿入フラグメントを合成する。cDNA挿入物を増幅するために使用されるプライマーは、発現ベクターに増幅産物をクローニングするために、プライマーの5'末端にBamHIおよびXbaIのような制限部位を好ましくは含むべきである。例えば、BamHIおよびXbaIは、細菌性発現ベクターpQE-9(Qiagen, Inc., Chatsworth, CA)の制限酵素部位に対応する。このプラスミドベクターは、抗生物質耐性(Amp^r)、細菌の複製起点(ori)、IPTGで調節可能なプロモーター/オペレーター(P/O)、リボソーム結合部位(RBS)、6-ヒスチジンタグ(6-His)、および制限酵素クローニング部位をコードする。

【0682】

pQE-9ベクターをBamHIおよびXbaIで消化し、そして、増幅されたフラグメントを細菌性RBSにおいて開始されるリーディングフレームを維持しながらpQE-9ベクターに連結する。次いで連結混合物を、lacIリプレッサーを発現し、またカナマイシン耐性(Kan^r)を与えるプラスミドpREP4の多重コピーを含む、E.coli株M15/rep4(Qiagen, Inc.)を形質転換するために使用する。形質転換体を、それらのLBプレート上で生育する能力によって同定し、そしてアンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを単離し、そして制限分析によって確認する。

【0683】

所望の構築物を含むクローンを、Amp(100 μg/ml)およびKan(25 μg/ml)の両方を補充したLB培地における液体培養で一晩(O/N)増殖させる。O/N培養物を、1:100~1:250の比で大量培養物に接種するために使用する。細胞を、0.4と0.6との間の光学密度600(OD₆₀₀)まで増殖させる。次いで、IPTG(イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド)を最終濃度1mMになるように加える。IPTGは、lacIリプレッサーの不活化により誘導し、P/Oの障害物を除去し、遺伝子発現の増

加を導く。

【0684】

細胞を、さらに3～4時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離(6000×gで20分間)によって収集する。細胞ペレットを、カオトロピック剤である6MグアニジンHCl中に、4で3～4時間攪拌することによって可溶化させる。細胞細片を遠心分離によって取り除き、そしてポリペプチドを含む上清を、ニッケル-ニトリロ三酢酸(「Ni-NTA」)アフィニティー樹脂カラム(QIAGEN, Inc. 前出より入手可能)にロードする。6×Hisタグを有するタンパク質は、Ni-NTA樹脂に高い親和性で結合し、そして単純な1工程手順で精製され得る(詳細には、The QIAexpressionist(1995) QIAGEN, Inc., 前出を参照のこと)。

【0685】

手短に言えば、上清を、6Mグアニジン-HCl、pH8のカラムにロードし、カラムを、最初に10容量の6Mグアニジン-HCl、pH8で洗浄し、次いで10容量の6Mグアニジン-HCl、pH6で洗浄し、最後にポリペプチドを、6Mグアニジン-HCl、pH5で溶出する。

【0686】

次いで、精製したタンパク質を、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)または50mM 酢酸ナトリウム、pH6の緩衝液および200mM NaClに対して透析することにより再生させる。あるいは、タンパク質はNi-NTAカラムに固定化している間に、首尾よく再折畳みされ得る。推奨条件は以下の通りである：プロテアーゼインヒビターを含む、500mM NaCl、20%グリセロール、20mM Tris/HCl pH7.4中の6M～1M尿素の直線勾配を使用する再生。再生は1.5時間以上の時間をかけて行うべきである。再生後、タンパク質を250mMイミダゾールの添加によって溶出させる。イミダゾールを、PBSまたは50mM酢酸ナトリウム pH6の緩衝液および200mM NaClに対する最終の透析工程によって除去する。精製したタンパク質を、4で保存するか、または-80で冷凍する。

【0687】

上記の発現ベクターに加えて、本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドに作動可能に連結されたファージオペレーターおよびプロモーターエレメントを含み、pHE4aと呼ばれる発現ベクターを含む(ATCC受託番号209645、1998年2月25日に寄託)。このベクターは以下を含む：1) 選択マーカーとしてのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、2) E. coli複製起点、3) T5ファージプロモーター配列、4) 2つのlacオペレーター配列、5) シャイン-ダルガーノ配列、および6) ラクトースオペロンリプレッサー遺伝子(lacIq)。複製起点(oriC)は、pUC19(LTI, Gaithersburg, MD)に由来する。プロモーター配列およびオペレーター配列を合成的に作製する。

【0688】

NdeIおよびXbaI、BamHI、XhoI、またはAsp718によってベクターを制限処理し、制限生成物をゲルで泳動し、そしてより大きな方のフラグメント(スタッファー(stuffer)フラグメントは約310塩基対であるべきである)を単離することによって、DNAをpHEaに挿入し得る。DNA挿入物を、NdeI(5'プライマー)およびXbaI、BamHI、XhoI、またはAsp718(3'プライマー)に対する制限部位を有するPCRプライマーを使用して、実施例1に記載のPCRプロトコルに従って生成する。PCR挿入物を、ゲル精製し、そして適合する酵素で制限処理する。挿入物およびベクターを標準的なプロトコルに従って連結する。

【0689】

操作されたベクターは、上記のプロトコルにおいて、細菌系でタンパク質を発現させるために容易に置換され得る。

【0690】

(実施例6：封入体からのポリペプチドの精製)

以下の別の方法は、ポリペプチドが封入体の形態で存在する場合に、E. coli中で発現されたポリペプチドを精製するために使用され得る。他に指定されない場合には、以下のすべての工程は4~10で行われる。

【0691】

E. coli 発酵の生産期の完了後、細胞培養物を4~10 に冷却し、そして15,000 rpmの連続遠心分離(Heraeus Sepatech)によって細胞を採集する。細胞ペーストの単位重量あたりのタンパク質の予想される収量および必要とされる精製タンパク質の量に基づいて、細胞ペーストの適切な量(重量による)を、100mM Tris、50mM EDTA、pH7.4を含む緩衝溶液に懸濁させる。細胞を、高剪断ミキサーを使用して均質な懸濁液に分散させる。

【0692】

次いで、細胞をマイクロフルイダイザー(microfluidizer)(Microfluidics, Corp.またはAPV Gaulin, Inc.)に2回、4000~6000 psiで溶液を通すことによって溶解させる。次いでホモジネートを、最終濃度0.5M NaClになるようにNaCl溶液と混合し、続いて7000×gで15分間遠心分離を行う。得られたペレットを、0.5M NaCl、100mM Tris、50mM EDTA、pH7.4を使用して再度洗浄する。

【0693】

得られた洗浄した封入体を、1.5M 塩酸グアニジン(GuHCl)で2~4時間可溶化する。7000×gで15分間の遠心分離の後、ペレットを廃棄し、そしてポリペプチドを含む上清を4 で一晩インキュベートしてさらなるGuHCl抽出を可能にする。

【0694】

不溶性粒子を除去するための高速遠心分離(30,000×g)に続き、GuHCl可溶化タンパク質を、GuHCl抽出物と、50mM ナトリウム、pH4.5、150mM NaCl、2mM EDTAを含む20容量の緩衝液とを、激しい攪拌で迅速に混合することによって、再折畳みさせる。再折畳みした希釈タンパク質溶液を、さらなる精製工程の前の12時間、混合しないで4 で保つ。

【0695】

再折畳みされたポリペプチド溶液を清澄にするために、40mM酢酸ナトリウ

ム、pH 6.0で平衡化した、適切な表面積を有する0.16 µmメンブレンフィルターを備えるあらかじめ準備した接線濾過ユニット（例えば、Filtro n）を使用する。濾過したサンプルを、カチオン交換樹脂（例えば、Poros HS-50, Perseptive Biosystems）上にロードする。カラムを40mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0で洗浄し、そして同じ緩衝液中の250mM、500mM、1000mM、および1500mM NaClで、段階的な様式で溶出する。溶出液の280nmにおける吸光度を連続的にモニターする。画分を収集し、そしてSDS-PAGEによってさらに分析する。

【0696】

次いでポリペプチドを含む画分をプールし、そして4容量の水と混合する。次いで希釈されたサンプルを、あらかじめ準備した強アニオン（Poros HQ-50, Perseptive Biosystems）交換樹脂および弱アニオン（Poros CM-20, Perseptive Biosystems）交換樹脂の直列カラムのセットにロードする。カラムを40mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0で平衡化する。両方のカラムを、40mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0、200mM NaClで洗浄する。次いでCM-20カラムを10カラム容量の直線勾配（0.2M NaCl、50mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0から1.0M NaCl、50mM 酢酸ナトリウム、pH 6.5の範囲）を用いて溶出させる。画分を、溶出液の定常 A_{280} モニタリング下で収集する。次いで、（例えば、16% SDS-PAGEによって判明した）ポリペプチドを含む画分をプールする。

【0697】

得られたポリペプチドは、上記の再折畳みおよび精製工程の後で95%より高い純度を示すはずである。5 µgの精製タンパク質がロードされる場合、いかなる主たる混在バンドも、クマシーブルー染色した16% SDS-PAGEゲルから観察されないはずである。精製タンパク質はまた、エンドトキシン/LPS混在について試験され得、そして代表的には、LPS含量はLALアッセイに従って、0.1 ng/ml未満である。

【0698】

(実施例7：バキュロウイルス発現系におけるポリペプチドのクローニングおよび発現)

この実施例では、ポリペプチドを発現するために、プラスミドシャトルベクター-pA2を使用してポリヌクレオチドをバキュロウイルスに挿入する。この発現ベクターは、*Autographa californica*核多核体ウイルス(AcMNPV)の強力なポリヘドリンプロモーター、続いてBamHI、XbaI、およびAsp718のような便利な制限部位を含む。シミアンウイルス40(「SV40」)のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、プラスミドは、同方向にある弱い*Drosophila*プロモーターの制御下で*E. coli*由来の λ -ガラクトシダーゼ遺伝子、続いてポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。挿入された遺伝子は両方の側で、クローン化したポリヌクレオチドを発現する生存可能なウイルスを生成する、野生型ウイルスDNAとの細胞媒介性の相同組換えのためのウイルス配列と隣接する。

【0699】

他の多くのバキュロウイルスベクター(例えば、pAc373、pVL941、およびpAcIM1)は、当業者が容易に理解するように、必要とされる場合、構築物が転写、翻訳、分泌などのために適切に配置されたシグナル(シグナルペプチドおよびインフレームなAUGを含む)を提供する限りにおいて、上記のベクターの代わりに使用され得る。このようなベクターは、例えば、Luckowら、*Virology* 170:31-39(1989)に記載される。

【0700】

具体的には、寄託されたクローンに含まれるcDNA配列(これは、表1に確認されるAUG開始コドンおよび天然に付随するリーダー配列を含む)を、実施例1に記載されるPCRプロトコルを使用して増幅させる。天然に存在するシグナル配列を使用して分泌タンパク質を産生する場合、pA2ベクターは第2のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、ベクターは、Summersら(「*A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Proc*

edures」、Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987))に記載される標準的な方法を用いて改変して、バキュロウイルスリーダー配列を含ませ得る (pA2 GP)。

【0701】

増幅されたフラグメントを、市販のキット (「GeneClean」, BIO 101 Inc., La Jolla, Ca) を使用して、1%アガロースゲルから単離する。次いでフラグメントを適切な制限酵素で消化し、そして再び1%アガロースゲルで精製する。

【0702】

プラスミドを対応する制限酵素で消化し、そして必要に応じて、当該分野で公知の慣用の手順を用いて、仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸化し得る。次いでDNAを、市販のキット (「GeneClean」BIO 101 Inc., La Jolla, Ca) を使用して、1%アガロースゲルから単離する。

【0703】

フラグメントおよび脱リン酸化したプラスミドを、T4 DNAリガーゼを用いて互いに連結する。E. coli HB101またはXL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Ca) 細胞のような他の適切なE. coli 宿主を、連結混合液で形質転換し、そして培養プレート上に拡げる。プラスミドを含む細菌を、個々のコロニー由来のDNAを消化し、そして消化産物をゲル電気泳動によって分析することにより同定する。クローニングしたフラグメントの配列をDNA配列決定によって確認する。

【0704】

このポリヌクレオチドを含む5 µgのプラスミドを、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417 (1987) によって記載されたリポフェクション法を使用して、1.0 µgの市販の線状化バキュロウイルスDNA (「BaculoGold™ baculovi

rus DNA」, Pharmingen, San Diego, CA) とともに同時トランスフェクトする。1 μ g の BaculoGold™ ウイルスDNA および 5 μ g のプラスミドを、50 μ l の無血清グレース培地 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) を含む、マイクロタイタープレートの滅菌したウェル中で混合する。その後、10 μ l のリポフェクチンおよび 90 μ l グレース培地を加え、混合し、そして室温で 15 分間インキュベートする。次いで、トランスフェクション混合液を、無血清グレース培地 1 ml を加えた 35 mm 組織培養プレートに播種した Sf9 昆虫細胞 (ATCC CRL 1711) に滴下して加える。次いでプレートを 27 °C で 5 時間インキュベートする。次いで、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして 10% ウシ胎仔血清を補充した 1 ml のグレース昆虫培地を添加する。次いで培養を 27 °C で 4 日間継続する。

【0705】

4 日後上清を収集し、Summers および Smith、前出によって記載されたようにブランクアッセイを行う。「Blue Gal」(Life Technologies Inc., Gaithersburg) を含むアガロースゲルを、gal が発現しているクローン (青色に着色したブランクを生ずる) の容易な同定および単離を可能にするために使用する。(この型の「ブランクアッセイ」の詳細な説明はまた、Life Technologies Inc., Gaithersburg によって配布される、昆虫細胞培養およびバキュロウイルス学のための使用者ガイドの中の 9 - 10 頁に見出され得る)。適切なインキュベーションの後、青色に着色したブランクをマイクロピペッター (例えば、Eppendorf) のチップで拾う。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、200 μ l のグレース培地を含む微小遠心分離チューブ中で再懸濁させ、そして組換えバキュロウイルスを含む懸濁液を、35 mm ディッシュに播種した Sf9 細胞に感染させるために使用する。4 日後、これらの培養ディッシュの上清を採集し、次いで 4 °C に貯蔵する。

【0706】

ポリペプチドの発現を確認するために、10% 熱非働化 FBS を補充したグレ

ース培地中でSF9細胞を増殖させる。細胞を、約2の感染多重度(「MOI」)でポリヌクレオチドを含む組換えバキュロウイルスで感染させる。放射性標識したタンパク質を所望する場合には、6時間後に培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを含まないSF900 II培地(Life Technologies Inc., Rockville, MDから入手可能)に置き換える。42時間後、5 μ Ciの³⁵S-メチオニンおよび5 μ Ciの³⁵S-システイン(Amershamから入手可能)を添加する。細胞をさらに16時間インキュベートし、次いで遠心分離によって採集する。上清中のタンパク質および細胞内タンパク質を、SDS-PAGE、次いで(放射性標識した場合)オートラジオグラフィーによって分析する。

【0707】

精製タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の微量配列決定法を使用して、産生されたタンパク質のアミノ末端配列を決定し得る。

【0708】

(実施例8：哺乳動物細胞におけるポリペプチドの発現)

本発明のポリペプチドを、哺乳動物細胞中で発現させ得る。代表的な哺乳動物発現ベクターは、mRNAの転写の開始を媒介するプロモーターエレメント、タンパク質コード配列、ならびに転写の終結および転写物のポリアデニル化に必要なシグナルを含む。さらなるエレメントは、エンハンサー、コザック配列、および、RNAスプライシングのドナー部位およびアクセプター部位に隣接する介在配列を含む。非常に効率的な転写は、SV40由来の初期および後期プロモーター、レトロウイルス(例えばRSV、HTLVI、HIVI)由来の長末端反復(LTR)、およびサイトメガロウイルス(CMV)の初期プロモーターを用いて達成される。しかし、細胞エレメント(例えば、ヒトアクチンプロモーター)もまた、使用され得る。

【0709】

本発明を実施する際の使用に適切な発現ベクターは、例えば、pSVLおよびpMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pRSVcat(ATCC 37152)、pSV2dhfr(ATCC 37146)、

pBC12MI (ATCC 67109)、pCMV Sport 2.0、ならびにpCMV Sport 3.0のようなベクターを含む。使用され得る哺乳動物宿主細胞は、ヒトHeLa細胞、293細胞、H9細胞およびJurkat細胞、マウスNIH3T3細胞およびC127細胞、Cos 1細胞、Cos 7細胞およびCV1細胞、ウズラQC1-3細胞、マウスL細胞、ならびにチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を含む。

【0710】

あるいは、ポリペプチドは、染色体に組み込まれたポリヌクレオチドを含む、安定な細胞株中で発現され得る。dhfr、gpt、ネオマイシン、ハイグロマイシンのような選択可能なマーカーを用いる同時トランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞の同定および単離を可能にする。

【0711】

トランスフェクトされた遺伝子はまた、大量のコードされたタンパク質を発現するために増幅され得る。DHFR(ジヒドロ葉酸還元酵素)マーカーは、目的の遺伝子の数百または数千さえものコピーを有する細胞株の開発に有用である。(例えば、Alt, F.W.ら、J. Biol. Chem. 253:1357-1370(1978); Hamlin, J.L.およびMa, C., Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143(1990): Page, M.J.およびSydenham, M.A., Biotechnology 9:64-68(1991)を参照のこと)。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ(GS)である(Murphyら、Biochem J. 227:277-279(1991); Bebbingtonら、Bio/Technology 10:169-175(1992))。これらのマーカーを使用して、哺乳動物細胞を選択培地中で増殖させ、そしてもっとも高い耐性を有する細胞を選択する。これらの細胞株は、染色体に組み込まれた、増幅された遺伝子を含む。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)およびNSO細胞は、タンパク質の産生のためにしばしば使用される。

【0712】

プラスミドpSV2-dhfr(ATCC受託番号37146)の誘導体であ

る、発現ベクターpC4(ATCC受託番号209646)およびpC6(ATCC受託番号209647)は、ラウス肉腫ウイルス(Cullenら、Molecular and Cellular Biology, 438-447(1985年3月))の強力なプロモーター(LTR)、およびCMVエンハンサー(Boshartら、Cell 41:521-530(1985))のフラグメントを含む。例えば、BamHI、XbaI、およびAsp718の制限酵素切断部位を有するマルチプルクローニングサイトは、目的の遺伝子のクローニングを容易にする。ベクターはまた、ラットプレプロインスリン遺伝子の3'イントロン、ポリアデニル化および終結シグナル、ならびに、SV40初期プロモーターの制御下にあるマウスDHFR遺伝子を含む。

【0713】

具体的には、例えば、プラスミドpC6を、適切な制限酵素によって消化し、次いで当該分野で公知の手順によって、仔ウシ腸ホスファターゼ(phosphatase)を使用して脱リン酸化する。次いで、このベクターを1%アガロースゲルから単離する。

【0714】

本発明のポリヌクレオチドは、必要な場合、適切な制限部位および開始/停止コドンを用いて実施例1に概説するプロトコルに従って増幅される。このベクターは分泌のために必要な場合、異種シグナル配列を含むように改変され得る(例えば、WO96/34891を参照のこと)。

【0715】

増幅フラグメントを、市販のキット(「GeneClean」、BIO 101 Inc.、La Jolla, Ca.)を使用して、1%アガロースゲルから単離する。次いで、このフラグメントを、適切な制限酵素で消化し、そして再び1%アガロースゲルで精製する。

【0716】

次いで、増幅フラグメントを同じ制限酵素で消化し、そして1%アガロースゲルで精製する。次いで、単離されたフラグメントおよび脱リン酸したベクターを、T4 DNAリガーゼで連結する。次いで、E. coli HB101細胞ま

たはX L - 1 B l u e細胞を形質転換し、そしてプラスミドp C 6に挿入されたフラグメントを含む細菌を、例えば、制限酵素分析を用いて同定する。

【0717】

活性なD H F R遺伝子を欠損するチャイニーズハムスター卵巣細胞を、トランスフェクションに使用する。5 μ gの発現プラスミドp C 6を、リポフェクチン (F e l g n e r ら、前出) を用いて、0 . 5 μ gのプラスミドp S V n e oと同時にトランスフェクトする。プラスミドp S V 2 - n e oは、優性で選択可能なマーカーであるところの、G 4 1 8を含む抗生物質の群に対する耐性を付与する酵素をコードするT n 5由来のn e o遺伝子を含む。この細胞を、1 m g / m lのG 4 1 8を補充した マイナスMEMに播種する。2日後、この細胞をトリプシン処理し、そして1 0、2 5、または5 0 n g / m lのメトトレキサートおよび1 m g / m lのG 4 1 8を補充した マイナスMEM中のハイブリドーマクロニングプレート (G r e i n e r , G e r m a n y) 中に播種する。約1 0 ~ 1 4日後、単一のクローンをトリプシン処理し、次いで異なる濃度のメトトレキサート (5 0 n M、1 0 0 n M、2 0 0 n M、4 0 0 n M、8 0 0 n M) を使用して、6ウェルのペトリ皿または1 0 m lのフラスコに播種する。次いで、最高濃度のメトトレキサートで増殖するクローンを、さらに高い濃度のメトトレキサート (1 μ M、2 μ M、5 μ M、1 0 m M、2 0 m M) を含む新たな6ウェルプレートに移す。同じ手順を、1 0 0 ~ 2 0 0 μ Mの濃度で増殖するクローンが得られるまで繰り返す。所望の遺伝子産物の発現を、例えば、S D S - P A G Eおよびウエスタンブロットによって、または逆相H P L C分析によって分析する。

【0718】

(実施例9：タンパク質融合物)

本発明のポリペプチドは、好ましくは、他のタンパク質に融合される。これらの融合タンパク質は、種々の適用に使用され得る。例えば、本発明のポリペプチドの、H i s タグ、H A タグ、プロテインA、I g Gドメイン、およびマルトース結合タンパク質への融合は、精製を容易にする (実施例5を参照のこと ; E P A 3 9 4 , 8 2 7もまた参照のこと ; T r a u n e c k e r ら、N a t u r e、3 3 1 : 8 4 - 8 6 (1 9 8 8))。このポリペプチドはまた、異種ポリペ

プチド配列（例えば、KDEL）に融合して分泌および細胞内輸送を促進し得る。さらに、IgG-1、IgG-3、およびアルブミンへの融合は、インビボでの半減期を増大させる。本発明のポリペプチドに融合した核局在化シグナルは、タンパク質を特定の細胞内局在に標的化し得る。一方、共有結合ヘテロ二量体またはホモ二量体は、融合タンパク質の活性を増大または減少させ得る。融合タンパク質はまた、1つより多い機能を有するキメラ分子を作製し得る。最後に、融合タンパク質は、非融合タンパク質と比較して、融合タンパク質の可溶性および/または安定性を増大させ得る。上記の融合タンパク質の全ての型は、IgG分子へのポリペプチドの融合を概説する以下のプロトコル、または実施例5に記載されるプロトコルを改変することによって作製され得る。

【0719】

簡単には、IgG分子のヒトFc部分は、以下に記載の配列の5'末端および3'末端にわたるプライマーを使用してPCR増幅され得る。これらのプライマーはまた、発現ベクター（好ましくは、哺乳動物発現ベクター）へのクローニングを容易にする都合の良い制限酵素部位、および必要な場合、開始/停止コドンを含むべきである。

【0720】

例えば、pC4（受託番号209646）が使用される場合、ヒトFc部分は、BamHIクローニング部位に連結され得る。3' BamHI部位が破壊されるべきであることに注意のこと。次に、ヒトFc部分を含有するベクターが、BamHIを用いて再び制限され、ベクターを線状化し、そして実施例1に記載されるPCRプロトコルによって単離された本発明のポリヌクレオチドが、このBamHI部位に連結される。ポリヌクレオチドは、終止コドンなしにクローニングされ、そうでなければ、融合タンパク質は産生されないことに注意すること。

【0721】

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

【0722】

【化2】

ヒト IgG Fc 領域:

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATTCG
 AGGGTGCACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACTC
 CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTAAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
 ACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAACCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
 CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC
 TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
 CCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
 GGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGC
 CGCGACTCTAGAGGAT (配列番号 1)

(実施例 10 : ポリペプチドの処方)

ポリペプチド組成物は、それぞれ、個々の患者の臨床状態（特に、分泌ポリペプチド単独を用いた処置の副作用）、送達部位、投与の方法、投与の計画、ならびに開業医に公知の他の因子を考慮に入れて、良好な医療行為と一致した様式において、処方および投薬される。従って、本明細書中での目的のための「有効量」は、このような考慮によって、決定される。

【0723】

一般的な提案として、一用量あたりに非経口的に投与されるポリペプチドの薬学的に有効な総量は、患者の体重の約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日} \sim 10 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ の範囲であるが、上記で注意したように、これは治療上の裁量を受ける。より好ましくは、この用量は、少なくとも $0.01 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ であり、そしてヒトに関して最も好ましくは、ホルモンについて、約 $0.01 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ と $1 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ との間である。連続して投与される場合、ポリペプチドは、代表的に、1日あたり1～4回の注射によるか、または、例えば、ミニポンプを使用する連続皮下注入のいずれかにより、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{時間} \sim 50 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{時間}$ の投薬速度で投与される。静脈内バッグ溶液もまた、使用され得る。変化を観

察するために必要である処置の長さ、および応答が生じるための処置後の間隔は、所望の効果に依存して変動するようである。

【0724】

本発明のポリペプチドを含む薬学的組成物は、経口的に、直腸に、非経口的に、槽内に (*intracistemally*)、腔内に、腹腔内に、局所的に (粉末、軟膏、ゲル、ドロップまたは経皮性パッチによるように)、頬側に (*bucally*)、または経口スプレーもしくは鼻内スプレーとして投与され得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液状充填剤、希釈剤、カプセル化材料または任意の型の処方補助物を意味する。本明細書中で使用される場合、用語「非経口的(な)」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内 (*intrasternal*)、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【0725】

ポリペプチドはまた、持続放出系によって適切に投与される。持続放出性の組成物の適切な例としては、成形品の形態 (例えば、フィルム、またはマイクロカプセル) の半透性のポリマーマトリクスが挙げられる。持続放出マトリクスとしては、ポリラクチド (米国特許第3,773,919号、EP 58,481)、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタメートとの共重合体 (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))、エチレンビニルアセテート (R. Langerら) またはポリ-D-(α)-3-ヒドロキシ酪酸 (EP 133,988) が挙げられる。持続放出性組成物はまた、リポソームに封入された (*liposomally entrapped*) ポリペプチドが挙げられる。分泌ポリペプチドを含むリポソームは、それ自体、公知の方法により調製される: DE 3,218,121; Epsteinら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); Hwangら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030-4

034(1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 日本国特許出願83-118008; 米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号; およびEP 102,324。通常、リポソームは、脂質含有量が約30m o lパーセントコレステロールより多い小さな(約200~800)単層型であり、選択された割合は、最適な分泌ポリペプチド療法について調整される。

【0726】

非経口的な投与に関して、1つの実施形態において、ポリペプチドは、一般に、薬学的に受容可能なキャリア(すなわち、使用される投薬量および濃度でレシピエントに非毒性であり、そしてこの処方他の成分と適合性であるもの)と共に単位投薬量注入可能形態(溶液、懸濁液または乳濁液)において、所望の程度の純度でそれらをそれぞれ混合することによって処方される。例えば、処方物は、好ましくは、酸化剤およびポリペプチドに対して有害であることが公知である他の化合物を含まない。

【0727】

一般に、処方物は、ポリペプチドを、液体キャリアもしくは細かく粉砕した固体キャリアまたは両方と、均一およびじかに接触させることにより調製される。次いで、必要である場合、産物は、所望の処方物へと成形される。好ましくは、このキャリアは、非経口的なキャリアであり、より好ましくは、レシピエントの血液と等張である溶液である。このようなキャリアビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンガー溶液、およびデキストロース溶液が挙げられる。非水溶性ビヒクル(例えば、不揮発性油およびオレイン酸エチル)はまた、リポソームと同様に、本明細書中で有用である。

【0728】

キャリアは、微量の添加物(例えば、等張性および化学的安定性を増強する物質)を適宜含む。このような物質は、使用される投薬量および濃度において、レシピエントに非毒性であり、そして緩衝液(例えば、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸、および他の有機酸またはそれらの塩類); 抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸); 低分子量(約10残基よりも小さい)のポリペプチド(例え

ば、ポリアルギニンまたはトリペプチド) ; 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、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニン) ; 単糖、二糖、および他の糖質 (セルロースもしくはその誘導体、グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む) ; 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) ; 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界面活性剤 (例えば、ポリソルベート、ポロキサマー (poloxamers)、またはPEG) を含む。

【0729】

ポリペプチドは、このようなビヒクル中で、代表的に、約3~8のpHで、約0.1mg/ml~100mg/mlの濃度、好ましくは1~10mg/mlの濃度で処方される。上記の賦形剤、キャリア、または安定化剤の特定のものの使用は、ポリペプチド塩の形成をもたらすことが理解される。

【0730】

治療的な投与のために使用される任意のポリペプチドは、無菌であり得る。無菌性は、滅菌濾過膜 (例えば、0.2ミクロン膜) による濾過により容易に達成される。治療ポリペプチド組成物は、一般に、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貫通可能なストッパーを有する点滴溶液バッグまたはバイアル) に配置される。

【0731】

ポリペプチドは、通常、単位用量容器または多用量容器 (例えば、密封アンブルまたは密封バイアル) 中に水溶液としてか、または再構成のための凍結乾燥した処方物として保存される。凍結乾燥した処方物の例として、10mlバイアルを、5mlの滅菌濾過した1% (w/v) 水性溶液で満たし、そして得られる混合物を凍結乾燥する。その注入溶液は、静菌注射用水を使用して、凍結乾燥したポリペプチドを再構成することにより調製される。

【0732】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の1つ以上の成分で満たされた1つ以上

の容器を含む薬学的パックまたはキットを提供する。薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形式における通告は、このような容器に伴い得る。この通告は、ヒトの投与のための製造、使用または販売の、この機関による認可を反映する。さらに、本発明のポリペプチドは、他の治療的化合物とともに使用され得る。

【0733】

(実施例11：ポリペプチドのレベル低下を処置する方法)

個体における本発明のポリペプチドの標準の発現レベルまたは正常発現レベルの低下により引き起こされる状態は、本発明のポリペプチドを好ましくは分泌形態および/または可溶性形態で投与することにより処置し得ることが理解される。従って、本発明はまた、このポリペプチドのレベルの増加が必要な個体の処置方法を提供する。この方法は、このような個体に、このような個体でこのポリペプチドの活性レベルを増加させる量のポリペプチドを含む治療的組成物を投与する工程を包含する。

【0734】

例えば、ポリペプチドのレベルが低下した患者は、そのポリペプチドを、1日用量0.1~100 μ g/kgで6日間続けて服用する。好ましくは、ポリペプチドは分泌形態である。投与および処方物に基づく投薬計画の正確な詳細は、実施例10に提供されている。

【0735】

(実施例12：ポリペプチドのレベル上昇を処置する方法)

アンチセンス技術を使用して本発明のポリペプチドの産生を阻害する。この技術は、ガンのような様々な病因に起因する、好ましくは分泌形態のポリペプチドのレベルを低下させる方法の1つの例である。

【0736】

例えば、ポリペプチドのレベルが異常に上昇したと診断された患者に、アンチセンスポリヌクレオチドを、0.5、1.0、1.5、2.0および3.0mg/kg/日で21日間、静脈内投与する。この処置に対して十分に寛容化された場合は、7日間の休薬期間後に、この処置を繰り返す。このアンチセンスポリヌ

クレオチドの処方は、実施例10に提供されている。

【0737】

(実施例13：遺伝子治療を使用する処置方法 - エキソビボ)

遺伝子治療の1つの方法は、ポリペプチドを発現し得る線維芽細胞を患者に移植する。一般に、線維芽細胞は、皮膚生検により被験者から得られる。得られた組織を組織培養培地中に配置し、小片に分割する。組織の小塊を組織培養フラスコの湿潤表面に置き、約10片を各フラスコに置く。このフラスコを倒置し、しっかりと閉めた後、室温で一晩放置する。室温で24時間後、フラスコを反転させ、組織塊をフラスコの底に固定させたままにし、そして新鮮な培地(例えば、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するHamのF12培地)を添加する。次に、フラスコを37℃で約1週間インキュベートする。

【0738】

この時点で、新鮮な培地を添加し、次いで数日ごとに取り換える。さらに二週間培養した後に、単層の線維芽細胞が出現する。この単層をトリプシン処理し、さらに大きなフラスコにスケールアップする。

【0739】

モロニーマウス肉腫ウイルスの長末端反復が隣接するpMV-7(Kirschmeier, P.T.ら、DNA, 7:219-25(1988))をEcoRIおよびHindIIIで消化した後、仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。線状ベクターをアガロースゲル上で分画し、そしてガラスビーズを使用して精製する。

【0740】

本発明のポリペプチドをコードするcDNAを、プライマーを用い、そして必要な場合、適切な制限部位および開始/終止コドンを含む、実施例1に記載のそれぞれ5'末端配列および3'末端配列に対応するPCRプライマーを使用して増幅し得る。好ましくは、この5'プライマーはEcoRI部位を含み、そしてこの3'プライマーはHindIII部位を含む。等量の、モロニーマウス肉腫ウイルスの線状骨格および増幅したEcoRIおよびHindIIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を、こ

の2つのフラグメントを連結するのに適した条件下で維持する。次に、連結混合物を使用し、細菌HB101を形質転換する。次に、それを、カナマイシンを含む寒天上にプレーティングし、ベクターが正確に挿入された目的の遺伝子を有することを確認する。

【0741】

両種指向性pA317またはGP+am12パッケージング細胞を、10%仔ウシ血清(CS)、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中、組織培養でコンフルエントな密度まで増殖させる。次に、その遺伝子を含むMSVベクターを培地に加え、そしてパッケージング細胞をこのベクターで形質導入する。このとき、このパッケージング細胞は、その遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する(ここで、このパッケージング細胞をプロデューサー細胞という)。

【0742】

形質導入されたプロデューサー細胞に新鮮な培地を添加し、次いでこの培地を10cmプレートのコンフルエントなプロデューサー細胞から採取する。感染性ウイルス粒子を含む使用済み培地を、ミリポアフィルターを通して濾過し、はがれたプロデューサー細胞を除去した後、この培地を使用して、線維芽細胞を感染させる。線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから培地を除去し、そしてプロデューサー細胞からの培地で速やかに置き換える。この培地を除去し、そして新鮮な培地と置き換える。ウイルスの力価が高ければ、実質的にすべての線維芽細胞が感染され、選択は必要ではない。力価が非常に低ければ、neoまたはhisのような選択マーカーを有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。一旦、線維芽細胞が効率的に感染したなら、その線維芽細胞を分析し、タンパク質が産生されているか否かを決定する。

【0743】

次に、操作された線維芽細胞を、単独で、またはサイトデックス3マイクロキャリアビーズ上でコンフルエントに増殖させた後のいずれかで、宿主に移植する。

【0744】

(実施例14：内因性I g S F 遺伝子を使用する遺伝子治療)

本発明に従う遺伝子治療の別の方法は、内因性I g S F 遺伝子配列を、例えば、米国特許番号5,641,670(1997年6月24日発行)；国際公開番号WO 96/29411(1996年9月26日公開)；国際公開番号WO 94/12650(1994年8月4日公開)；Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932~8935(1989)；およびZijlstraら、Nature, 342:435~438(1989)に記載されるように、相同組換えを介してプロモーターに作動可能に結合する工程を包含する。この方法は、その標的細胞中に存在するが、その細胞中では発現されないかまたは所望されるよりも低いレベルで発現される、遺伝子の活性化を包含する。

【0745】

プロモーターおよび標的化配列を含むポリヌクレオチド構築物を作製する。この標的化配列は、プロモーターに隣接する、内因性I g S F 遺伝子の5'非コード配列に相同である。この標的化配列は、このI g S F 遺伝子の5'末端に十分に近く、その結果、このプロモーターは、相同組換えの際にこの内因性配列に作動可能に連結される。このプロモーターおよび標的化配列を、PCRを使用して増幅し得る。好ましくは、この増幅したプロモーターは、5'末端および3'末端上に異なる制限酵素部位を含む。好ましくは、第1の標的化配列の3'末端は、増幅したプロモーターの5'末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第2の標的化配列の5'末端は、増幅したプロモーターの3'末端と同じ制限部位を含む。

【0746】

この増幅したプロモーターおよび増幅した標的化配列を、適切な制限酵素で消化し、続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。消化したプロモーターおよび消化した標的化配列を、T4 DNAリガーゼの存在下でともに加える。生じた混合物を、これら2つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。この構築物をアガロースゲルでサイズ分画し、次いでフェノール抽出およびエタノール沈殿により精製する。

【0747】

この実施例において、このポリヌクレオチド構築物を、エレクトロポレーションを介して裸のポリヌクレオチドとして投与する。しかし、このポリヌクレオチド構築物はまた、トランスフェクション促進剤（例えば、リポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、沈殿剤など）とともに投与され得る。送達のこのような方法は、当該分野で公知である。

【0748】

一旦、細胞をトランスフェクトすると、相同組換えが生じて、このプロモーターがこの内因性 I g S F 遺伝子配列に作動可能に連結される。これは、この細胞中におけるこの I g S F の発現を生じる。発現は、免疫学的染色または当該分野で公知の他の任意の方法により、検出され得る。

【0749】

線維芽細胞を、皮膚生検により被験者から得る。得られた組織を、DMEM + 10%ウシ胎仔血清中に配置する。対数増殖期または定常期初期の線維芽細胞を、トリプシン処理し、そしてプラスチックの表面から栄養培地でリンスする。細胞懸濁液のアリコートをし、計数のために取り出し、そして残りの細胞を遠心分離に供する。上清を吸引し、そしてペレットを5mlのエレクトロポレーション緩衝液（20mM HEPES pH7.3、137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM Na₂HPO₄、6mMデキストロース）に再懸濁する。この細胞を再遠心分離し、上清を吸引し、そして細胞をアセチル化ウシ血清アルブミン1mg/mlを含むエレクトロポレーション緩衝液に再懸濁する。この最終細胞懸濁物は、約3 × 10⁶細胞/mlを含む。エレクトロポレーションを、再懸濁直後に実施すべきである。

【0750】

プラスミドDNAを、標準的技術に従って調製する。例えば、I g S F 遺伝子座に標的化するためのプラスミドを構築するために、プラスミドpUC18（MBI Fermentas、Amherst、NY）をHindIIIで消化する。CMVプロモーターを、5'末端にXbaI部位および3'末端にBamHI部位を備えてPCRにより増幅する。2つのI g S F 非コード遺伝子配列をP

CRを介して増幅する：一方のIgSF非コード配列（IgSFフラグメント1）を、5'末端にHindIII部位および3'末端にXbaI部位を備えて増幅する；他方のIgSF非コード配列（IgSFフラグメント2）を、5'末端にBamHI部位および3'末端にHindIII部位を備えて増幅する。このCMVプロモーターおよびIgSFフラグメントを、適切な酵素（CMVプロモーター-XbaIおよびBamHI；IgSFフラグメント1-XbaI；IgSFフラグメント2-BamHI）で消化し、そしてともに連結する。生じた連結生成物をHindIIIで消化し、そしてHindIIIで消化したpUC18プラスミドと連結する。

【0751】

プラスミドDNAを、0.4cmの電極ギャップを備える滅菌キュベット（Bio-Rad）に添加する。最終DNA濃度は、一般的に、少なくとも120μg/mlである。次いで、この細胞懸濁液の0.5ml（約 1.5×10^6 細胞を含む）をこのキュベットに添加し、そしてこの細胞懸濁液およびDNA溶液を、穏やかに混合する。エレクトロポレーションを、Gene-Pulser装置（Bio-Rad）を用いて実施する。キャパシタンスおよび電圧を、それぞれ、960μFおよび250~300Vに設定する。電圧が増加すると、細胞の生存が減少するが、導入されたDNAをそのゲノム中に安定に組込む生存細胞の割合が劇的に増加する。これらのパラメーターを考慮すると、パルス時間約14~20mSecが観察されるはずである。

【0752】

エレクトロポレーションした細胞を、室温で約5分間維持し、次いで、このキュベットの中身を、滅菌した移動ピペットを用いて穏やかに取り出す。この細胞を、10cmのディッシュ中の、予め温めた栄養培地（15%仔ウシ血清を含むDMEM）10mlに直接加え、そして37℃でインキュベートする。翌日、この培地を吸引し、そして10mlの新鮮な培地で置換し、そしてさらに16~24時間インキュベートする。

【0753】

次いで、操作された線維芽細胞を、宿主中に、単独か、またはサイトデックス

(cytodex) 3マイクロキャリア(microcarrier)ビーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後かのいずれかで、注入する。ここで、この線維芽細胞は、タンパク質産物を生成する。次いで、この線維芽細胞を、上記のような患者に導入し得る。

【0754】

(実施例15：遺伝子治療を使用する処置方法 - インビボ)

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するためにインビボ遺伝子治療方法を使用することである。この遺伝子治療法は、IgSFポリペプチドの発現を増大または減少させるための、動物への裸の核酸(DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA) IgSF配列の導入に関する。IgSFポリヌクレオチドは、プロモーター、または標的組織によるIgSFポリペプチドの発現に必要な任意の他の遺伝子エレメントに、作動可能に連結され得る。このような遺伝子治療および送達の技術および方法は、当該分野で公知であり、例えば、WO90/11092、WO98/11779；米国特許第5693622号、同第5705151号、同第5580859号；Tabataら、Cardiovasc. Res. 35(3)：470-479(1997)；Chaoら、Pharmacol. Res. 35(6)：517-522(1997)；Wolff、Neuromuscul. Disord. 7(5)：314-318(1997)、Schwartzら、Gene Ther., 3(5)：405-411(1996)；Tsurumi Y.ら、Circulation 94(12)：3281-3290(1996) (本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【0755】

IgSFポリヌクレオチド構築物は、注入可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法(例えば、組織(心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など)の間隙空間への注入)によって送達され得る。IgSFポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリア中で送達され得る。

【0756】

用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、細胞への侵入を補助

、促進、または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈澱剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、IgSFポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法によって調製され得るリポソーム処方物（例えば、Felgnerら *Ann. NY Acad. Sci.*, 772:126-139 (1995) およびAbdallahら *Biol. Cell* 85(1):1-7 (1995) で教示されたもの）中で送達され得る。

【0757】

この遺伝子治療方法において使用されるIgSFポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列も含まない構築物である。当業者に公知の任意の強力なプロモーターが、DNAの発現を駆動するために用いられ得る。他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの間の期間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【0758】

ポリヌクレオチド構築物を、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を含む）の間隙空間に送達され得る。組織の間隙空間は、細胞間液、器官組織の細網線維間のムコ多糖マトリクス、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは筋肉細胞を囲む結合組織内の同じマトリクス（that same matrix）または骨の裂孔中の結合組織内の同じマトリクス（that same matrix）を含む。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下に記載の理由のために好ましい。このポリヌクレオチド構築物を、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達し得る。このポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、持続性の分化した非分裂細胞に送達され、その細胞に

において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞）において達成され得る。インビボ筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そしてこのポリヌクレオチドを発現する能力において、特に適格である。

【0759】

裸の I g S F ポリヌクレオチド注射のために、DNA または RNA の有効投薬量は、約 0.05 g / kg 体重 ~ 約 50 mg / kg 体重の範囲にある。好ましくは、投薬量は、約 0.005 mg / kg ~ 約 20 mg / kg であり、そしてより好ましくは、約 0.05 mg / kg ~ 約 5 mg / kg である。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注射の組織部位に従って変動する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注射経路によってである。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に肺または気管支組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸の I g S F ポリヌクレオチド構築物を、血管形成術の間にこの手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達し得る。

【0760】

インビボでの筋肉における注射された I g S F ポリヌクレオチドの用量応答効果を、以下のようにして決定する。I g S F ポリペプチドをコードする mRNA の生成のために適切な I g S F 鋳型 DNA を、標準的な組換え DNA 方法論に従って調製する。鋳型 DNA（これは環状または直鎖状のいずれかであり得る）を裸の DNA として使用するか、またはリポソームと複合体化するかのいずれかを行う。次いで、マウスの四頭筋に、多様な量のこの鋳型 DNA を注射する。

【0761】

5 ~ 6 週齢の雌性および雄性の B a l b / C マウスに、0.3 ml の 2.5% A v e r t i n を腹腔内注射することにより麻酔する。1.5 cm の切開を大腿前部で行い、そして四頭筋を直接可視化する。I g S F 鋳型 DNA を、0.1 ml のキャリアに入れて、1 cc 注射器で 27 ゲージ針を通して 1 分間にわたって

、この筋肉の遠位挿入部位から約0.5cmの位置で膝に、約0.2cmの深さで注射する。縫合を、将来の位置確認のために注射部位の上で行い、そして皮膚をステンレス鋼クリップで閉じる。

【0762】

適切なインキュベーション時間（例えば、7日）後、筋肉抽出物を、四頭全体を切り出すことによって調製する。個々の四頭筋の5枚目毎の15µm切片を、IgSFタンパク質発現について組織化学的に染色する。IgSFタンパク質発現についての時間経過は、異なるマウスから四頭筋を異なる時間に採取すること以外は、同様な様式で行い得る。注射後の筋肉中のIgSFのDNAの持続性を、注射したマウスおよびコントロールマウスから総細胞性DNAおよびHIRT上清を調製した後、サザンブロット分析によって決定し得る。マウスにおける上記実験の結果は、裸のIgSF DNAを用いて、ヒトおよび他の動物において適切な投薬量および他の処置パラメーターを推定するために使用し得る。

【0763】

（実施例16：抗体の産生）

a) ハイブリドーマ技術

本発明の抗体を、種々の方法によって調製し得る。（Current Protocols、第2章を参照のこと）。このような方法の1つの例として、IgSFポリペプチドを発現する細胞を、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために、動物に投与する。好ましい方法において、IgSFポリペプチドの調製物を調製し、そしてその調製物が、天然の夾雑物を実質的に含まないようにするために精製する。ついで、このような調製物を、より大きな比活性のポリクローナル抗体を産生するために、動物に導入する。

【0764】

IgSFポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を、ハイブリドーマ技術を使用して調製する（Kohlerら、Nature 256:495（1975）；Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:511（1976）；Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:292（1976）；Hammerlingら：Monoclonal Antibodies and

T - Cell Hybridomas、Elsevier、N.Y.、563 ~ 681頁(1981))。一般的に、動物(好ましくは、マウス)を、IgSFポリペプチドまたはより好ましくは分泌IgSFポリペプチド発現細胞で、免疫する。このようなポリペプチド発現細胞を、適切な任意の組織培養培地(好ましくは、10%ウシ胎仔血清(約56にて不活化)を補充し、そして約10g/lの非必須アミノ酸、約1,000U/mlのペニシリン、および約100μg/mlのストレプトマイシンを補充した、Earle's改変Eagle's培地)にて培養する。

【0765】

このようなマウスの脾細胞を抽出し、そして適切な骨髓腫細胞株と融合させる。適切な任意の骨髓腫細胞株を、本発明に従って使用し得るが、しかし、親骨髓腫細胞株(SP20)(ATCCから入手可能)を使用することが好ましい。融合後、生じたハイブリドーマ細胞を、HAT培地にて選択的に維持し、ついで、Wandsら(Gastroenterology 80:225~232(1981))により記載されるように、限界希釈によってクローン化する。ついで、このような選択を介して得たハイブリドーマ細胞をアッセイして、IgSFポリペプチドを結合し得る抗体を分泌するクローンを同定する。

【0766】

あるいは、IgSFポリペプチドに結合し得るさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を使用して2段階工程の手順において生成し得る。このような方法は、抗体それ自体が抗原であり、それゆえ第二の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を使用して、動物(好ましくは、マウス)を免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を使用して、ハイブリドーマ細胞を産生する。そして、このハイブリドーマ細胞は、IgSFタンパク質特異的抗体に結合する能力がIgSFポリペプチドによってブロックされ得る抗体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。このような抗体は、IgSFタンパク質特異的抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そして動物を免疫してさらなるIgSFタンパク質特異的抗体の形成を誘導するために使用される。

【0767】

ヒトにおける抗体のインビボ使用のために、抗体は、「ヒト化」される。このような抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝的構築物を使用することによって産生され得る。キメラ抗体およびヒト化抗体を産生するための方法は当該分野で公知であり、そして本明細書に議論される（総説については、Morrison, Science 229:1202 (1985); Oiら、BioTechniques 4:214 (1986); Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Taniguchiら、EP 171496; Morrisonら、EP 173494; Neubergerら、WO 8601533; Robinsonら、WO 8702671; Boulianneら、Nature 312:643 (1984); Neubergerら、Nature 314:268 (1985)を参照のこと）。

【0768】

(b) scFvのライブラリーからのIgSFポリペプチドに対して指向される抗体フラグメントの単離)

ヒトPBLから単離した天然に存在するV遺伝子を、IgSFポリペプチド（ドナーは、これらに対して曝露されていても曝露されていなくともよい）に対する反応性を含む抗体フラグメントのライブラリーに構築する（例えば、米国特許第5,885,793号（その全体が参考として本明細書に援用される）を参照のこと）。

【0769】

(ライブラリーのレスキュー(rescue))

PCT公開WO 92/01047に記載のように、ヒトPBLのRNAからscFvのライブラリーを構築する。抗体フラグメントを提示するファージをレスキューするため、ファージミドを保有する約 10^9 個のE. coliを用いて、50mlの2xTY（1%グルコースおよび100 μ g/mlのアンプシリンを含有する）（2xTY-AMP-GLU）を接種し、そして振盪しながら0.8のO.D.まで増殖させる。この培養物の5mlを用いて50mlの2xTY

- AMP - GLUに接種し、 2×10^8 TUの 遺伝子3ヘルパー (M13 遺伝子III、PCT公開WO92/01047を参照のこと)を添加し、そして培養物を振盪なしで37 で45分間インキュベートし、次いで振盪しながら37 で45分間インキュベートする。この培養物を10分間4000 r.p.m. で遠心分離し、そしてペレットを2リットルの2xTY (100 µg/mlアンピシリンおよび50 µg/mlカナマイシンを含有する)中に再懸濁し、そして一晩増殖させる。ファージをPCT公開WO92/01047に記載のように調製する。

【0770】

M13 遺伝子IIIを以下のように調製する：M13 遺伝子IIIヘルパーファージは、遺伝子IIIタンパク質をコードしない。それゆえ、抗体フラグメントを提示するファージ (ファージミド) は、抗原に対するより大きい結合アビディティーを有する。ファージ形態形成の間、野生型遺伝子IIIタンパク質を供給するpUC19誘導体を保有する細胞においてヘルパーファージを増殖させることにより、感染性M13 遺伝子III粒子を作製する。培養物を振盪なしで37 で1時間インキュベートし、次いで振盪しながら37 でさらに1時間インキュベートする。細胞を遠心沈殿 (IEC - Centra 8, 4000 r.p.m. で10分間) し、100 µg/mlのアンピシリンおよび25 µg/mlのカナマイシンを含有する2xTYブロス (2xTY - AMP - KAN) 300 ml中で再懸濁し、そして37 で振盪しながら一晩増殖させた。ファージ粒子を、2回のPEG沈殿 (Sambrookら、1990)により培養培地から精製および濃縮し、2 ml PBSに再懸濁し、そして0.45 µmのフィルター (Minisart NML; Sartorius)を通過させ、約 10^{13} 形質導入単位/ml (アンピシリン耐性クローン)の最終濃度を得る。

【0771】

(ライブラリーのパニング)

Immunotubes (Nunc)を、本発明のポリペプチドの100 µg/mlまたは10 µg/mlのいずれかの4 mlを用いてPBS中で一晩コーティングする。チューブを2% Marvel - PBSを用いて37 で2時間プロ

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

【0772】

(バインダーの特徴付け)

第3回目および4回目の選択から溶出したファージを用いて、E. coli HB 2151を感染させ、そして可溶性scFvをアッセイのために単一コロニーから生成する(Marksら、1991)。50mM炭酸水素塩、pH 9.6中の本発明のポリペプチドの10 μ g/mlのいずれかでコーティングしたマイクロタイタープレートを用いてELISAを実施する。ELISAにおける陽性クローンをPCRフィンガープリンティング(例えば、PCT公開WO92/01047を参照のこと)、次に配列決定することによりさらに特徴付ける。これらの陽性クローンはまた、当業者に公知の技術によって特徴付けされ得る(例えば、エピトープマッピング、結合アフィニティー、レセプターシグナル変換、抗体/抗原結合をブロックするか、または競合的に阻害する能力、および競合的なアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性)。

【0773】

(実施例17:細胞接着アッセイ)

免疫グロブリン(IgSF)スーパーファミリーメンバーが、細胞-細胞接着および細胞-細胞認識に関係する場合、Newhamらの細胞接着アッセイを、本発明の翻訳産物に対する接着に関係する細胞を同定するために利用する(Newman, P.ら、J. Biol. Chem. 272:19429-40(1997)、これは、本明細書中に参考として援用される)。簡単には、実施例9において記載されるようなFc融合タンパク質が、生成され、そして96ウェルプレートウェルをコートするために使用される。ウェルを、Newhamらにより記載されるように、室温で、60分間、HBSで希釈された50 μ lのFc融合タンパク質によりコートし、そして熱変性ウシ血清アルブミンを用いてブロックする。試験細胞株を、1400 \times gで、3分間遠心し、Dulbecco's 最小基本培地、25mM HEPES中で洗浄し、25mM HEPESにおいて 1×10^6 /mlで再懸濁し、そして10分間37 $^{\circ}$ Cで回復させる。50 μ lアリコートした細胞を、50 μ lのHBS、0.2mM MnCl₂を含むFc融合タンパク質コートされたウェルに添加し、そして20分間、37 $^{\circ}$ Cで、7%(v/v)CO₂の加湿した環境にインキュベートする。未処理のウェルに接着した細胞を、細胞数の定量を可能にするために、20 μ lの50%(v/v)グルタルアルデヒドを用いて直接固定する。非特異的に接着した細胞を、実験用ウェルから吸引し、そして残った細胞を、5%(v/v)グルタルアルデヒドを用いて固定する。次いで、固定された細胞が、H₂Oで3回洗浄し、そして0.2M MES、pH6において、0.1%(w/v)クリスタルバイオレットで、60分間染色する。過剰な染色を、細胞が、10%(v/v)酢酸で溶解される前に、3回の水洗浄で落とし、そして放出された染色を、分光光度的にA_{560nm}で測定される。上記の例は、本発明のクローンの翻訳産物への結合のために改変され、複数かつ異なる細胞株の試験を容易にし得ることは当業者に明らかである。

【0774】

本発明の特定のIgSFポリヌクレオチドおよびポリペプチド(抗体を含む)は、米国仮出願シリアル番号第60/152,248号に開示され、これは、その全体において参考として本明細書中で援用される。

【0775】

本発明を、前述の説明および実施例に詳細に記載された以外の方法で実施し得ることは、明らかである。本発明の多数の改変およびバリエーションが、上記の教示を考慮して可能であり、従って、それは、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【0776】

発明の背景、詳細な説明および実施例において引用された各文書の全開示（特許、特許出願、学術文献、要約、実験マニュアル、書籍または他の開示を含む）は、本明細書中に参考として援用される。さらに、本明細書にとともに提出された配列表のハードコピーおよび対応するコンピュータ読み出し形態は、両方とも本明細書中にその全体が参考として援用される。

【0777】

【表8】

サンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【0778】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0779】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

【0780】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

【0781】

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

ATCC受託番号PTA-621

頁3

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0782】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする

。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト (l i s t o f r e c o g n i z e d e x p e r t s) に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0783】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (l a p s e d) される日までは、特許法31F(1)の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第22C条または第25条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【0784】

【表9】

出願人または代理人の参照番号

国際出願番号

PT015PCT

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13規則の2)

A. 表示は明細書中下記の箇所で言及された微生物に関してなされた。

25 頁、

N/A 行

B. 寄託物の表示

その他の寄託物が追加の用紙に記載されている。

寄託機関の名称

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

寄託機関の住所 (郵便番号および国を含む)

アメリカ合衆国

バージニア 20110-2209、マナサス

ユニバーシティ ブールバード 10801

寄託日

2000年8月7日

受託番号

PTA-2330

C. 追加の表示 (なければ空白のまま)

この情報は追付の用紙に続く

D. 表示がなされた指定締結国 (全ての指定締結国に対する表示ではない場合)

欧州

EPOが求められる指定機関に関して、寄託された微生物の試料は、欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、または特許出願が拒絶され、取り下げられ、もしくは取り下げられたものとみなされる日まで、試料の請求人により指名された専門家に試料を分譲することによってのみ入手可能になる。(EPC規則28(4))

E. 別に添付する表示物 (なければ空白のまま)

下記の表示物は、追って国際事務局に提出する (表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定)

受理官庁記入欄

国際事務局記入欄

 この用紙は国際出願とともに受理された

 この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された

認定官

認定官

PCT/RO/134様式 (1992年7月)

ATCC 受託番号 PTA - 2330

頁 2

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対してのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料の

サンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

【0785】

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0786】

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

【0787】

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

【0788】

(英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

ATCC受託番号PTA - 2330

頁3

(デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0789】

(スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする

。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト (l i s t o f r e c o g n i z e d e x p e r t s) に記載された任意の者が、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

【0790】

(オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄 (l a p s e d) される日までは、特許法31F(1)の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第22C条または第25条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

【配列表】

<110> Human Genome Sciences, Inc.

<120> Immunoglobulin Superfamily Polynucleotides, Polypeptides, and Antibodies

<130> PT015PCT

<140> Unassigned

<141> 2000-08-29

<150> 60/152,248

<151> 1999-09-03

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 733

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gggatccgga	gcccaaatct	tctgacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	60
aattcgaggg	tgccaccgtca	gtcttcctct	tcccccaaa	acccaaggac	accctcatga	120
ctccccggac	tcctgaggtc	acatgcgtgg	tggtggacgt	aagccacgaa	gaccctgagg	180
tcaagttcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgctgg	240
aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	300
ggctgaatgg	caaggagtac	aagtgcgaagg	tctccaacaa	agcctccca	accccatcg	360
agaaaacat	ctccaagcc	aaagggcagc	cccagagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	420
catccccgga	tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	480
atccaagcga	catcgccgtg	gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagAAC	aactacaaga	540
ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttctc	ctacagcaag	ctcaaccgtg	600
acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	660
acaaccacta	cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaatgagt	cgacggccgc	720
gactctagag	gat					733

<210> 2

<211> 1033

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggcagcaaga	tggtgttgca	gaccagggtc	ttcatttctc	tgttgctctg	gatctctggg	60
gcttacggcg	acatcgtgat	gaccagctct	ccagactccc	tggtgtgtgc	tctgggagag	120
agggccacca	tcaactgcaa	gtccagccag	actgttttat	acagctccga	caataagaac	180
tacttagctt	ggtaccagca	gaaaccagga	cagcctccta	agctgctcat	ttactgggca	240
tctaccgggg	aatccggggg	ccctgaccga	ttcagtgcca	gcgggtctgg	gacagatttc	300
actctcacca	tcagcagcct	gcaggctgaa	gatgtggcag	tttattactg	tcagcaatat	360
tatagtactc	cgtacagttt	tggccagggg	accaagctgg	aaatcaaacg	aactgtggct	420
gcaccatctg	tcttcatctt	ccgcccattc	gatgagcagt	tgaaatctgg	aactgcctct	480
gttgtgtgcc	tgctgaataa	cttctatccc	agagaggcca	aagtacagtg	gaagggtgat	540
aacgcccctc	aatcgggtaa	ctcccaggag	agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	600
acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg	agcaaacgag	actacgagaa	acacaaagtc	660
tacgcctcgc	aagtcaccca	tcagggcctg	agctcgcctg	tcacaaagag	cttcaacagg	720
ggagagtgtt	agagggagaa	gtgccccccac	ctgctcctca	gttccagcct	gacccccctc	780
catcctttgg	cctctgacct	ttttccaca	ggggacctac	ccctattgag	gtcctccagc	840
tcatctttca	cctcaccccc	ctcctcctcc	ttggctttaa	ttatgctaata	gttggaggag	900
aatgaataaa	taaagtgaat	ctttgcaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	960
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaaa	aaa					1033

<210> 3
 <211> 2487
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gactccacag gcgtgaccc gagccagagc taccctggaa gctatcccca gttccagacc 60
 tgctcttggc tgggtgagagt ggagcccgcac tataacatct cctcacagt ggagtacttc 120
 ctccagcaga agcaatatga tgagtttgag atttttgatg gtccatcagg acagagctct 180
 ctgctgaaag ccctcagtgga gaattactca gctcccctga ttgtcaccag ctcaagcaac 240
 tctgtgtacc tgcgttggtc atctgatcac gcctacaatc ggaagggctt caagatccgc 300
 tattcagccc ctctactgcag cctgcccagg gctccactcc atggcttccat cctaggccag 360
 accagcacc agcccggggg ctccatccac ttggctgca acgcccggta ccgctgggtg 420
 ggacacagca tggccatctg taccggcac ccccagggt accacctgtg gagcgaagcc 480
 atccctctct gtcaagctct ttccctgtggg ctccctgagg cccccaagaa tggatgggtg 540
 ttggcaagg agtacacagt gggaaccaag gccgtgtaca gctgcagtga aggtaccac 600
 ctccagcag gcgctgagcc cactgcagag tgtctggaca caggcctatg gagcaaccgc 660
 aatgtcccac cacagtgtgt ccctgtgact tgtcctgatg tcagtagcat cagcgtggag 720
 catggccgat ggaggcttat ctttgagaca cagtatcagt tccaggccca gctgatgctc 780
 atctgtgacc ctggctacta ctatactggc caaagggtca tccgctgtca ggccaatggc 840
 aatggagcc tggggactc tacgccacc tggcgaatca tctctgtgg agagctcccg 900
 attccccca atggcccagc catcggaaca ctgtctgtct acggggcaac agccatcttc 960
 tctgtcaatt ccggatacac actggtgggc tccagggtgc gtgagtgcag ggccaatggg 1020
 ctctggagtg gctctgaagt ccgctgcctt gctggacact gtgggactcc tgagccatt 1080
 gtcaacggag acatcaatgg ggagaactac agctaccggg gcagtggtgt gtaccaatgc 1140
 aatgctggct tccgctgat cggcatgtct gtgcgcatct gccagcagga tcatcactgg 1200
 tggggcaaga ccctttctg tgtgccaatt acctgtggac acccaggcaa cctgtcaac 1260
 ggctcactc aggytaacca gtttaacctc aacgatgtgg tcaagtttgt ttgcaacctc 1320
 gggatatgg ctgagggggc tctaggttc caatgcctgg ccagcgggca atggagtgc 1380
 atgctgccca ctgacagaat catcaactgt acagatctg acaccaaga aaatagtgtt 1440
 cgtcaggtcc acgcccagcg cccgcacagg ttcagcttcg gcaccactgt gtctaccgg 1500
 tgcaaccacg gcttctacct cctgggcacc ccagtgctca gctgccaggg agatggcaca 1560
 tgggaccgct cccgcccca gtgtctcttg gtgtcctgtg gccatccggg ctccccgct 1620
 cactcccaga tgtctggaga cagttatact gtgggagcag tgggtgcgta cagctgcac 1680
 ggcaagcgtc ctctgggtgg aaacagcacc cgcattgtgt ggttggatgg acactggact 1740
 ggtccctccc ctcaactgctc aggaaccagc gtgggagttt gcggtgacct tgggatcccg 1800
 gctcatggca tccgtttggg ggacagcttt gatccaggca ctgtgatcgc cttcagctgt 1860
 gaagctggcc acgtgctccg gggatcgtca gagcgcacct gtcaagccaa tggctcgtgg 1920
 agcggctcgc agcctgagtg tggagtgatc tcttgtggga accctgggac tccaagtaat 1980
 gcccgagttg tgttcagtga tggcctggtt ttctccagct ctatcgtcta tgagtgcagg 2040
 gaaggatact acgccacagc cctgctcagc cgtcactgct cgggtcaatgg taccctggaca 2100
 tgcagtgacc ctgagtgcc cggtgagagc tcaggcccta cgggttccat ggccaacagt 2160
 ggcccagatc ctgcatgcca gaggagaagg ctatccatgg aagatgggtc agaatggttg 2220
 ggatggctcg acttgaacct gaacgataat catatgaata gcctctgttg agcatatgct 2280
 atgtggcagc cactgagcga agtactttat ttcatacgca catttcattt gatcttcac 2340
 ataactcgt aactccgtga agtagctact attatcccca ttttgtatat gagatggctg 2400
 aggctcagag aggcagagaa tatatggttg ccatttctca ggtcttagcc aaaaaaaaa 2460
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 2487

<210> 4
 <211> 873
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 tgcaccacag cgtccgggtg gtctctgctg ggctgctctc tctgtccggc ctgcaccggc 60
 tccaacgtac tccaaaaatt caggtttact caccgcacc cgcagagaat ggaaagccaa 120
 atttcttgaa ctgctatgtg tcaggattcc acccaccaga aatcgaaatc gaactgctga 180
 agaatggaga gaagatgaat gcagaacagt ctgacctgtc ttccagcaag gactggagtt 240
 tctatctctt ggtccacact gaattcactc ccaatggaca ggatgaattt agctgccgtg 300
 tgaagcaggt tactctcaa aatccccagg tcgttaaatg ggagcagagac aactaaccag 360
 catcatggag gtttgaagat tgtgcttata gattgctgta atgtcaaatg ctatgctctt 420
 gttattgctg atatgctttt atgctttatg catataaatc atagtcatat tgatgatgat 480
 acaaatataa tctactagt aattctacat tgatcattct gttgctgtat ttgaccgctc 540
 taagcaggtg gctgtagtgt tggggctgga aaaatcttgg agagaattct catggtcaga 600

actgaattgt	tcagttctatt	cacacaaaag	atagttatgc	atgttttagag	ttaatttcca	660
atttgcatac	tttgtttaga	atattggggga	aattttttaga	aagataacct	ctaagttact	720
ggaaatttgt	tatagtgggt	aagacactgt	cctaataatc	tcattcacct	cttacatcag	780
aaacattgtt	gcacacaatt	tgacttaatg	ttaattttgt	ttcaataatt	aaaacaattg	840
taaaacttga	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa			873

<210> 5
 <211> 3040
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SITE
 <222> (528)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> SITE
 <222> (616)
 <223> n equals a,t,g, or c

<220>
 <221> SITE
 <222> (630)
 <223> n equals a,t,g, or c

<400> 5						
gctcgtgccc	agaggatgat	cgacgcgctc	ttcagttttg	atagcagaat	caaggtggtt	60
gccaatggga	ccctgggtgg	gaaatcagtg	acggacaaaag	atgccggaga	ttacctgtgc	120
gtagctcgaa	ataaggttgg	tgatgactac	gtgggtgctca	aagtggatgt	ggtgatgaaa	180
ccggccaaga	ttgaacacaa	ggaggagaac	gaccacaaaag	tcttctacgg	gggtgacctg	240
aaagtggact	gtgtggccac	cgggcttccc	aatcccgaga	tctcctggag	cctcccagac	300
gggagtctgg	tgaactcctt	catgcagtcg	gatgacagcg	gtggacgcac	caagcgctat	360
gtcgtcttca	acaatgggac	acttactttt	aacgaagtgg	ggatgaggga	ggaaggagac	420
tacacctgct	ttgctgaaaa	tcaggtcggg	aaggacgaga	tgagagttag	agtcaaggtg	480
gtgacagcgc	ccgycaccat	ccggaacaag	acttacttgg	cggttcangt	gcctatgga	540
gacgtgggtca	ctgtarcctg	tgaggccaaa	ggagaaccca	tgccccagggt	gacttgggtg	600
tccccaccga	acaaangtga	tccccacctn	ctctgagaag	tatcagatat	accaagatg	660
gcactctcct	tattcagaaa	gcccagcgtt	ctgacagcgg	caactacacc	tgcttgggtca	720
ggaacagcgc	gggagaggat	aggaagacgg	tgtggattca	cgteaacgtc	cagccaccca	780
agatcaacgg	taacccccac	cccatcacca	ccgtgcggga	gatagcagcc	gggggcagtc	840
ggaaaactgat	tgactgcaaa	gctgaaggca	tccccacccc	gaggggtgta	tgggcttttc	900
ccgaggggtgt	ggttctgcca	gctccatact	atggaaaccg	gatcactgtc	catggcaacg	960
gttcccttga	catcaggagt	ttgaggaaga	gcgactccgt	ccagctggta	tgcatggcac	1020
gcaacgaggg	aggggagggc	aggttgatcc	tgcaagctcac	tgctcctggag	cccattggaga	1080
aacccatctt	ccacgaccgg	atctgcagag	tggaacagcag	ctgcagcgc	tctaccacaa	1140
ggctgacggc	atgctacaca	ttagcgggtct	ctcctcgggtg	gacgccgggg	cctaccgctg	1200
cgtggcccgc	aatgccgctg	gccacacgga	gaggctgggtc	tccctgaagg	tgggactgaa	1260
gccagaagca	aacaagcagt	atcataacct	ggtcagcatc	atcaatggtg	agaccctgaa	1320
gctccccctgc	accocctccc	gggctgggca	gggacgttct	tccctggacgc	tccccaatgg	1380
catgcactctg	gagggcccc	aaaccctggg	acgcgtttct	cttctggaca	atggcaccct	1440
cacggttcgt	gagggcctcg	tgtttgacag	gggtacctat	gtatgcagga	tggagacgga	1500
gtacggccct	tcgggtcacca	gcatccccgt	gattgtgatc	gcctatcctc	cccggatcac	1560
cagcgagccc	accocgggtca	tctacacccg	gcccgggaac	accgtgaaac	tgaactgcac	1620
ggctatgggg	attccccaaag	ctgacatcac	gtgggagtta	ccggataagt	cgcatctgaa	1680
ggcaggggtt	caggctcgtc	tgtatggaaa	cagatttctt	cacccccagg	gatcactgac	1740
catccagcat	gccacacaga	gagatgccgg	cttctacaag	tgcatggcaa	aaaacattct	1800
cggcagtgac	tccaaaaaaa	cttacatcca	cgtctctgga	aatgtggatt	ccagaatgat	1860
tgcttaggaa	ctgacaacaa	agcgggggtt	gtaagggaa	ccaggttggg	gaataggagc	1920
tcttaataaa	tgtgtcacag	tgcatgggtg	cctctgggtg	gtttcaagt	gaggttgatc	1980
ttgatctaca	attggttggga	aaaggaagca	atgcagacac	gagaaggagg	gctcagcctt	2040
gctgagacac	tttcttttgt	gtttacatca	tgccaggggc	ttcattcagg	gtgtctgtgc	2100
tctgactgca	atttttcttt	ttttgcaaat	gccactcgac	tgccctcata	agcgtccata	2160
ggatatctga	ggaacattca	tcaaaaataa	gccatagaca	tgaacaacac	ctcactacc	2220
cattgaagac	gcatcaccta	gttaacctgc	tgcaagtttt	acatgataga	ctttgttcca	2280

gattgacaag	tcattctttca	gttatttctct	ctgtcacttc	aaaactccag	cttgcccaat	2340
aaggatttag	aaccagagtg	actgatataat	atatatattt	taattcagag	ttacatacat	2400
acagctacca	ttttatatga	aaaaagaaaa	acatttcttc	ctggaactca	cttttttatat	2460
aatgttttat	atataatatt	tttcttttca	aatcagacga	tgagactaga	aggagaata	2520
ctttctgtct	tattaaaatt	aataaattat	tggtctttac	aagacttggg	tacattacag	2580
cagacatgga	aatataattt	taaaaaattt	ctctccaacc	tccttcaa	tcagtcacca	2640
ctgttatatt	accttctcca	ggaaccctcc	agtggggaag	gctgcgatat	tagatttctt	2700
tgatgcaaaa	gtttttgttg	aaagctgtgc	tcagaggagg	tgagaggaga	ggaaggagaa	2760
aactgcatca	taactttaca	gaattgaatc	tagagtcttc	ccccgaaagc	ccagaaactt	2820
ctctgcagta	ctggcttgt	ccatctggtc	taaggtggct	gcttcttccc	cagccatgag	2880
tcagttttgt	cccataaata	atacacgacc	tgttatttcc	atgactgctt	tactgtattt	2940
ttaaaggtcaa	tatactgtac	atttgataat	aaaataatat	tctcccaaaa	aaaaaagtcg	3000
agcgcccgcg	aatttagtag	tagtagtagt	agtagtaggc			3040

<210> 6
 <211> 1753
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6						
agaaaacaag	acaagcccat	tcattcattt	gagcatagca	agagatggtg	gcacacctga	60
aaccatggcc	ccaaccattg	tggttccccc	gggcaacaga	agtgtgggtg	ctggatccag	120
tgagaccacc	ttggaatgta	tagccagtg	cagggcctgtg	gaggacctga	gtgtgacctg	180
gaagaggaat	ggagtgagaa	tcaccagtg	cctccacagc	tttggaagac	gcctcaccat	240
cagcaaccog	acggttcgog	acaccgggcc	atcgtctctc	gagggcgggc	tgccggggag	300
cgcttttgaa	ccggccaggg	cgacggcctt	tcttttctac	atagagccac	catattttac	360
tgctgagccc	gagagtccga	tttcagctga	agtagaagaa	actgtggaca	tcggatgtca	420
agccatgggg	gtcccccttc	ccaccctcca	gtggtacaag	gatgccatct	ccatcagcag	480
gctccagaat	cctcgataca	aagtgtctgc	cagcggaggc	ctgcgcatcc	agaagctgcg	540
tccagaggac	tccggaatct	tccagtgctt	cgcagcaat	gaaggagggg	agatccagac	600
ccacagttac	tgacgggatg	acagccattc	taaggtgtga	ggtgtccggg	gctcccaaac	660
ccgccatcac	ctggaaaaga	gaaaaccaca	ttctggccag	tggtctgtgc	cggattccta	720
ggttcatgct	tcttgaatcg	gggggtctac	agatcgcgcc	cgtctctcat	caggatgccg	780
gcaactacac	ctgtctatg	gccaacacag	agggctccct	gaatgcctcg	gccacgctca	840
ctgtgtggag	taaggagcag	ccctcgcaag	tcggccttct	gtagccacg	gtttaatcat	900
cacgtcatcg	tgtgctttgg	ggatgtcagc	atgcccttgg	gcttgcta	ttaatcaaaa	960
gagaatgatt	atttttacaa	ctaatttata	gaaatctgtt	gagaaattaa	attttcaatg	1020
tctaaaagaa	tacctagaaa	atgtattcag	agatttaata	ggggcattgc	aggagagacg	1080
aaagattgac	tttgtaaagt	cagtgagag	attacacaaa	actagctcaa	atcacaaaat	1140
tgacaggttg	gttaattttta	taagcatttt	ataagaaaat	taagaattaa	aatcctaag	1200
aagtaaatatt	ttgttaaaca	ttgttaggg	acaactaaaa	cacttcta	acactaacca	1260
tcagtgtttc	ttgtatgta	ggagtgaact	gaaagaaaat	ctttcgcttt	tgctaacaaa	1320
ttgttaggaa	caactaagac	acttctaata	tactaactat	caatgtttct	tgtatattag	1380
gagtgaactg	aaagaaaatc	ttcagctttt	gcacttttta	aatcaagac	acatttttga	1440
aatgcagagt	agttttctgg	agcttaagga	ttggaccaaa	tggtccccca	ttgccacttt	1500
ttacttcaa	ttgccaatac	actttctcct	ctctgtctca	tctcaatctg	tactactaaa	1560
aactcatatt	caaaaagcaa	aagaatgtct	actcagattt	ttacaaatct	atctacatga	1620
ggagagaaag	ttttaacttg	cttgaggag	taatttgttg	aaacgttatt	cttcagaaa	1680
aagtaaatca	ttgtgtctca	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1740
aaaaaaaaaa	aaa					1753

<210> 7
 <211> 1182
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7						
ggtccaggcg	ccgctgtccc	agcagaggtg	ggtggggggc	agtgtggagc	tgactgcca	60
ggcgtgggg	agcccgggtg	ccgagatcca	gtgggtggtt	gaagggcag	gtcccaacga	120
caactgctcc	cagctctggg	acggcgccc	gctggaccgc	gtccacatcc	acgccacct	180
ccaccagcac	gcgccagca	ccatctccat	cgacacgctc	gtggaggagg	acacgggac	240
ttacagagt	cggccagca	acgaccggga	tcgcaaccac	ctgaccggg	cggccaggt	300
caagtgggtc	cgcgccag	cagctgtgct	agtcctggaa	cgtgagtgcc	gggcacctcc	360
ctccccgct	ccctcagttt	ccctctgtg	ccgctcgct	ccggctcct	gctcagtaga	420

```

accagacgc ctcctccct ctcggtccg ctgtgcccg ttgggcccac cgcctggacg 480
gaggggccc gacctgaagg ggggtggctc gccgctgac caccagcgt gggcggcctg 540
gctcggggca ggcagggctc tgccctccag cagggtgggtc ctcgtcctcc cctcgaccct 600
cgtgccatcc gtcccgctgt ttctgcttcc ccgggcgctc gcccggtccc ctcctgagc 660
gtccatactg caagcctgag gggccctcca agctcagccc aggcttgtag gtctcagaac 720
cttctgtgtc cttcgcagca tctcgttcta agggattttc aaatttcaat tcctagcggg 780
aatattgtaa actaaccaag aaccaagaga ttgcttggg tggggattgg cagaagaacc 840
ggggtgctcc cagcactgct ggagtgcctg cagcctgggg ctggggggat gtggggccac 900
ctgagtgcct cctagagaag ggcacgggag cctgggcccg ggggtgctgt gctatttttt 960
tttttttcc tggagatgga gtcttgctgt tcccaggtgg agtgtgggtg cacaatctcg 1020
gctcactgca acttccgctt ccgggttcca agcgattctt ctgcctcagc ctcctgagta 1080
gctgggatta caggcatgag ccaacatgcc cagctaattt tttgtatttt tagaagagac 1140
ggggtttcac cgtgttagcc aggatggtct cgatctccc ac 1182

```

<210> 8

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

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

```

<210> 9
 <211> 613
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Met Ala Ile Cys Thr Arg His Pro Gln Gly Tyr His Leu Trp Ser Glu
 1 5 10 15
 Ala Ile Pro Leu Cys Gln Ala Leu Ser Cys Gly Leu Pro Glu Ala Pro.
 20 25 30
 Lys Asn Gly Met Val Phe Gly Lys Glu Tyr Thr Val Gly Thr Lys Ala
 35 40 45
 Val Tyr Ser Cys Ser Glu Gly Tyr His Leu Gln Ala Gly Ala Glu Ala
 50 55 60
 Thr Ala Glu Cys Leu Asp Thr Gly Leu Trp Ser Asn Arg Asn Val Pro
 65 70 75 80
 Pro Gln Cys Val Pro Val Thr Cys Pro Asp Val Ser Ser Ile Ser Val
 85 90 95
 Glu His Gly Arg Trp Arg Leu Ile Phe Glu Thr Gln Tyr Gln Phe Gln
 100 105 110
 Ala Gln Leu Met Leu Ile Cys Asp Pro Gly Tyr Tyr Tyr Thr Gly Gln
 115 120 125
 Arg Val Ile Arg Cys Gln Ala Asn Gly Lys Trp Ser Leu Gly Asp Ser
 130 135 140
 Thr Pro Thr Cys Arg Ile Ile Ser Cys Gly Glu Leu Pro Ile Pro Pro
 145 150 155 160
 Asn Gly His Arg Ile Gly Thr Leu Ser Val Tyr Gly Ala Thr Ala Ile
 165 170 175
 Phe Ser Cys Asn Ser Gly Tyr Thr Leu Val Gly Ser Arg Val Arg Glu
 180 185 190
 Cys Met Ala Asn Gly Leu Trp Ser Gly Ser Glu Val Arg Cys Leu Ala
 195 200 205
 Gly His Cys Gly Thr Pro Glu Pro Ile Val Asn Gly His Ile Asn Gly
 210 215 220
 Glu Asn Tyr Ser Tyr Arg Gly Ser Val Val Tyr Gln Cys Asn Ala Gly
 225 230 235 240
 Phe Arg Leu Ile Gly Met Ser Val Arg Ile Cys Gln Gln Asp His His
 245 250 255
 Trp Ser Gly Lys Thr Pro Phe Cys Val Pro Ile Thr Cys Gly His Pro
 260 265 270
 Gly Asn Pro Val Asn Gly Leu Thr Gln Gly Asn Gln Phe Asn Leu Asn
 275 280 285
 Asp Val Val Lys Phe Val Cys Asn Pro Gly Tyr Met Ala Glu Gly Ala
 290 295 300

Ala Arg Ser Gln Cys Leu Ala Ser Gly Gln Trp Ser Asp Met Leu Pro
 305 310 315 320
 Thr Cys Arg Ile Ile Asn Cys Thr Asp Pro Gly His Gln Glu Asn Ser
 325 330 335
 Val Arg Gln Val His Ala Ser Gly Pro His Arg Phe Ser Phe Gly Thr
 340 345 350
 Thr Val Ser Tyr Arg Cys Asn His Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Thr Pro
 355 360 365
 Val Leu Ser Cys Gln Gly Asp Gly Thr Trp Asp Arg Pro Arg Pro Gln
 370 375 380
 Cys Leu Leu Val Ser Cys Gly His Pro Gly Ser Pro Pro His Ser Gln
 385 390 395 400
 Met Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Val Gly Ala Val Val Arg Tyr Ser Cys
 405 410 415
 Ile Gly Lys Arg Thr Leu Val Gly Asn Ser Thr Arg Met Cys Gly Leu
 420 425 430
 Asp Gly His Trp Thr Gly Ser Leu Pro His Cys Ser Gly Thr Ser Val
 435 440 445
 Gly Val Cys Gly Asp Pro Gly Ile Pro Ala His Gly Ile Arg Leu Gly
 450 455 460
 Asp Ser Phe Asp Pro Gly Thr Val Met Arg Phe Ser Cys Glu Ala Gly
 465 470 475 480
 His Val Leu Arg Gly Ser Ser Glu Arg Thr Cys Gln Ala Asn Gly Ser
 485 490 495
 Trp Ser Gly Ser Gln Pro Glu Cys Gly Val Ile Ser Cys Gly Asn Pro
 500 505 510
 Gly Thr Pro Ser Asn Ala Arg Val Val Phe Ser Asp Gly Leu Val Phe
 515 520 525
 Ser Ser Ser Ile Val Tyr Glu Cys Arg Glu Gly Tyr Tyr Ala Thr Gly
 530 535 540
 Leu Leu Ser Arg His Cys Ser Val Asn Gly Thr Trp Thr Gly Ser Asp
 545 550 555 560
 Pro Glu Cys Leu Gly Glu Ser Ser Gly Pro Thr Gly Ser Met Ala Asn
 565 570 575
 Ser Gly Pro Asp Pro Ala Cys Gln Arg Arg Arg Leu Ser Met Glu Asp
 580 585 590
 Gly Ala Glu Trp Leu Gly Trp Ser Asp Leu Asn Leu Asn Asp Asn His
 595 600 605
 Met Asn Ser Leu Cys
 610

<210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Asp Pro Arg Val Arg 5 Leu Val Phe Val Gly 10 Leu Leu Ser Leu Ser Gly 15
 1
 Leu His Ala Val Gln Arg Thr Pro Lys 25 Ile Gln Val Tyr Ser Arg His 30
 20
 Pro Ala Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly 45
 35 40
 Phe His Pro Pro Glu Ile Glu Ile Glu Leu Leu Lys Asn Gly Glu Lys 60
 50 55
 Met Asn Ala Glu Gln Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe 80
 65 70 75
 Tyr Leu Leu Val His Thr Glu Phe Thr Pro Asn Gly Gln Asp Glu Phe 95
 85 90
 Ser Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Lys Asn Pro Gln Val Val Lys 110
 100 105
 Trp Glu Arg Asp Asn 115

<210> 11
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Met Gly Phe Ser Arg 5 Gly Cys Gly Ser Ala Ser Ser Ile Leu Trp Lys 15
 1 10
 Pro Asp His Cys Pro Trp Gln Arg Phe Pro Gly His Gln Glu Phe Glu 30
 20 25
 Glu Glu Arg Leu Arg Pro Ala Gly Met His Gly Thr Gln Arg Gly Arg 45
 35 40
 Gly Gly Gln Val Asp Pro Ala Ala His Cys Pro Gly Ala His Gly Glu 60
 50 55
 Thr His Leu Pro Arg Pro Asp Leu Gln Ser Gly Gln Gln Leu Gln Arg 80
 65 70 75
 Phe Tyr His Lys Ala Asp Gly Met Leu His Ile Ser Gly Leu Ser Ser 95
 85 90
 Val Asp Ala Gly Ala Tyr Arg Cys Val Ala Arg Asn Ala Ala Gly His 110
 100 105
 Thr Glu Arg Leu Val Ser Leu Lys Val Gly Leu Lys Pro Glu Ala Asn 125
 115 120
 Lys Gln Tyr His Asn Leu Val Ser Ile Ile Asn Gly Glu Thr Leu Lys 140
 130 135
 Leu Pro Cys Thr Pro Pro Gly Ala Gly Gln Gly Arg Phe Ser Trp Thr 160
 145 150 155
 Leu Pro Asn Gly Met His Leu Glu Gly Pro Gln Thr Leu Gly Arg Val 175
 165 170

Ser Leu Leu Asp Asn Gly Thr Leu Thr Val Arg Glu Ala Ser Val Phe
 180 185 190
 Asp Arg Gly Thr Tyr Val Cys Arg Met Glu Thr Glu Tyr Gly Pro Ser
 195 200 205
 Val Thr Ser Ile Pro Val Ile Val Ile Ala Tyr Pro Pro Arg Ile Thr
 210 215 220
 Ser Glu Pro Thr Pro Val Ile Tyr Thr Arg Pro Gly Asn Thr Val Lys
 225 230 235 240
 Leu Asn Cys Met Ala Met Gly Ile Pro Lys Ala Asp Ile Thr Trp Glu
 245 250 255
 Leu Pro Asp Lys Ser His Leu Lys Ala Gly Val Gln Ala Arg Leu Tyr
 260 265 270
 Gly Asn Arg Phe Leu His Pro Gln Gly Ser Leu Thr Ile Gln His Ala
 275 280 285
 Thr Gln Arg Asp Ala Gly Phe Tyr Lys Cys Met Ala Lys Asn Ile Leu
 290 295 300
 Gly Ser Asp Ser Lys Thr Thr Tyr Ile His Val Phe
 305 310 315

<210> 12
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Ala Pro Thr Ile Val Val Pro Pro Gly Asn Arg Ser Val Val Ala
 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Glu Thr Thr Leu Glu Cys Ile Ala Ser Ala Arg Pro Val
 20 25 30
 Glu Asp Leu Ser Val Thr Trp Lys Arg Asn Gly Val Arg Ile Thr Ser
 35 40 45
 Gly Leu His Ser Phe Gly Arg Arg Leu Thr Ile Ser Asn Pro Thr Phe
 50 55 60
 Ala Asp Thr Gly Pro Tyr Val Cys Glu Ala Ala Leu Pro Gly Ser Ala
 65 70 75 80
 Phe Glu Pro Ala Arg Ala Thr Ala Phe Leu Phe Ile Ile Glu Pro Pro
 85 90 95
 Tyr Phe Thr Ala Glu Pro Glu Ser Arg Ile Ser Ala Glu Val Glu Glu
 100 105 110
 Thr Val Asp Ile Gly Cys Gln Ala Met Gly Val Pro Leu Pro Thr Leu
 115 120 125
 Gln Trp Tyr Lys Asp Ala Ile Ser Ile Ser Arg Leu Gln Asn Pro Arg
 130 135 140
 Tyr Lys Val Leu Ala Ser Gly Gly Leu Arg Ile Gln Lys Leu Arg Pro
 145 150 155 160
 Glu Asp Ser Gly Ile Phe Gln Cys Phe Ala Ser Asn Glu Gly Gly Glu
 165 170 175

Ile Gln Thr His Ser Tyr
180

<210> 13
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Val Gln Ala Pro Leu Ser Gln Gln Arg Trp Val Gly Gly Ser Val Glu
1 5 10 15
Leu His Cys Glu Ala Val Gly Ser Pro Val Pro Glu Ile Gln Trp Trp
20 25 30
Phe Glu Gly Gln Gly Pro Asn Asp Thr Cys Ser Gln Leu Trp Asp Gly
35 40 45
Ala Arg Leu Asp Arg Val His Ile His Ala Thr Tyr His Gln His Ala
50 55 60
Ala Ser Thr Ile Ser Ile Asp Thr Leu Val Glu Glu Asp Thr Gly Thr
65 70 75 80
Tyr Glu Cys Arg Ala Ser Asn Asp Pro Asp Arg Asn His Leu Thr Arg
85 90 95
Ala Pro Arg Val Lys Trp Val Arg Ala Gln Ala Val Val Leu Val Leu
100 105 110
Glu Arg Glu Trp Arg Ala Pro Pro Ser Pro Pro Pro Ser Val Ser Leu
115 120 125
Leu Cys Arg Ser Pro Pro Gly Ser Cys Ser Val Glu Pro Arg Arg Leu
130 135 140
Leu Pro Ser Pro Ser Arg Cys Ala Pro Leu Gly Pro Pro Pro Gly Arg
145 150 155 160
Arg Gly Pro Asp Leu Lys Gly Val Gly Ser Pro Pro Asp His Gln Arg
165 170 175
Trp Ala Ala Trp Leu Gly Ala Gly Arg Ala Leu Pro Ser Ser Arg Trp
180 185 190
Val Leu Val Leu Pro Ser Thr Leu Val Pro Ser Val Pro Ser Phe Leu
195 200 205
Leu Pro Arg Ala Pro Ala Arg Leu Pro Pro
210 215

<210> 14
<211> 81
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
1 5 10 15
Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
20 25 30

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 35 40 45
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 50 55 60
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 65 70 75 80
 Cys

<210> 15
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 16
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Cys Thr Pro Pro Gly Ala Gly Gln Gly Arg Phe Ser Trp Thr Leu Pro
 1 5 10 15
 Asn Gly Met His Leu Glu Gly Pro Gln Thr Leu Gly Arg Val Ser Leu
 20 25 30
 Leu Asp Asn Gly Thr Leu Thr Val Arg Glu Ala Ser Val Phe Asp Arg
 35 40 45
 Gly Thr Tyr Val Cys
 50

<210> 17
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

Arg Asp Ala Gly Phe Tyr Lys Cys
50 55

<210> 18
<211> 48
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Cys Ile Ala Ser Ala Arg Pro Val Glu Asp Leu Ser Val Thr Trp Lys
1 5 10 15

Arg Asn Gly Val Arg Ile Thr Ser Gly Leu His Ser Phe Gly Arg Arg
20 25 30

Leu Thr Ile Ser Asn Pro Thr Phe Ala Asp Thr Gly Pro Tyr Val Cys
35 40 45

<210> 19
<211> 51
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Cys Gln Ala Met Gly Val Pro Leu Pro Thr Leu Gln Trp Tyr Lys Asp
1 5 10 15

Ala Ile Ser Ile Ser Arg Leu Gln Asn Pro Arg Tyr Lys Val Leu Ala
20 25 30

Ser Gly Gly Leu Arg Ile Gln Lys Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Ile
35 40 45

Phe Gln Cys
50

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/23662
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 5/10, 15/12, 15/13, 15/63, 15/64; C07K 14/47 US CL : Please See Extra Sheet 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) U.S. : 530/350; 536/23.1, 23.5, 23.53, 24.3, 24.31; 435/69.1, 71.1, 71.2, 471, 252.3, 254.11, 325, 320.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, CAS ONLINE, MEDLINE, CAPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- A	WO 92/05256 A1 (GENETICS INSTITUTE, INC., THE WISTAR INSTITUTE) 02 April 1992 (02/04/92), see entire document, especially pages 17-21.	1-2, 5, 7-11, 14-16 3-4, 6, 12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family 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 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 number of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 02 NOVEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 15 DEC 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Pella Cullen for</i> PREMA MERTZ Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/23662**Box I. Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international 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:

2. Claims Nos.:
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:

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:

Please See Extra Sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-12, 14-16

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/23662

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

530/350; 536/23.1, 23.5, 23.53, 24.3, 24.31; 435/69.1, 71.1, 71.2, 471, 252.3, 254.11, 325, 320.1

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-12, 14-16, drawn to a nucleic acid of SEQ ID NO:2 encoding a protein of SEQ ID NO:8, a vector, a host cell, a method of making the protein and the protein of SEQ ID NO:8.

Group II, claim 13, drawn to an antibody that binds the protein of SEQ ID NO:8.

Group III, claim 17, drawn to a method of treating a condition comprising administering the protein of SEQ ID NO:8.

Group IV, claim 18, drawn to a method of diagnosing a pathological condition using the polynucleotide encoding a protein of SEQ ID NO:8.

Group V, claim 19, drawn to a method of diagnosing a pathological condition by determining the amount of protein of SEQ ID NO:8.

Group VI, claim 20-21, drawn to a method of identifying a binding partner of the protein of SEQ ID NO:8.

Group VII, claim 17, drawn to a method for treating a condition comprising administering the nucleic acid of SEQ ID NO:2.

The inventions listed as Groups I-VII do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group I) comprises the first-recited product, a nucleic acid encoding a protein of SEQ ID NO:8, a vector, a host cell, a method of making the protein of SEQ ID NO:8, and the protein of SEQ ID NO:8. Further pursuant to 37

C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack Unity of Invention because they are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for more than one species to be searched, the appropriate additional search fees must be paid. The species are as follows:

the polynucleotides set forth in SEQ ID NO:2-7 encoding the polypeptides set forth in SEQ ID NO:8-13.

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		9/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P	7/00		17/00	4 H 0 4 5
	9/10		25/00	
	17/00		29/00	
	25/00		31/00	
	29/00		35/00	
	31/00		37/02	
	35/00		37/08	
	37/02	C 0 7 K	14/47	
	37/08		16/18	
C 0 7 K	14/47		16/42	
	16/18	C 1 2 N	1/15	
	16/42		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21		21/08	
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 P	21/02		33/50	Z
	21/08		33/53	M
G 0 1 N	33/15		33/566	
	33/50	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/53		5/00	A
	33/566	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), 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 ヤング, ポール イー.
 アメリカ合衆国 メリーランド 20878,
 ゲイザースバーグ, ベックウィズ ス
 トリート 122

(72)発明者 ルーベン, スティーブン エム.
 アメリカ合衆国 メリーランド 20832,
 オルネイ, ヘリテイジ ヒルズ ドラ
 イブ 18528

(72)発明者 シ, ヤング
 アメリカ合衆国 メリーランド 20878,
 ゲイザースバーグ, アpartment
 102, ウエスト サイド ドライブ 437

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB10 BB14 BB20 BB24
 BB29 BB46 BB50 BB51 CB01
 DA13 FB02 FB03 FB05 FB08
 GC10
 4B024 AA01 AA11 BA58 BA61 CA04
 DA05 DA06 EA02 EA03 EA04
 GA11 HA11 HA17
 4B064 AF27 AG26 AG27 CA02 CA06
 CA10 CA19 DA03 DA13
 4B065 AA26X AA90X AA93Y AA95X
 AA98X AB01 AB04 BA01
 BA02 BA08 BA25 CA23 CA24
 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17
 BA01 BA08 BA22 BA23 MA01
 NA14 ZA012 ZA362 ZA402
 ZA512 ZB052 ZB072 ZB112
 ZB132 ZB212 ZB262 ZB322
 4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 EE01
 GG01
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16
 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA36
 ZA40 ZA51 ZB05 ZB07 ZB11
 ZB13 ZB21 ZB26 ZB32
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA54
 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50
 FA72 FA73 FA74

专利名称(译)	免疫球蛋白超家族多核苷酸，多肽和抗体		
公开(公告)号	JP2003533968A	公开(公告)日	2003-11-18
申请号	JP2001522388	申请日	2000-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	人类基因科学公司		
申请(专利权)人(译)	人类Jinomu科学公司		
[标]发明人	ヤングポールイー ルーベンスティーブンエム シヤング		
发明人	ヤング, ポール イー. ルーベン, スティーブン エム. シ, ヤング		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/42 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12N15/13 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P17/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/70503		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P7/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB29 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/GC10 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA58 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA17 4B064/AF27 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/DA03 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AA95X 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA01 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BA25 4B065/CA23 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/ZA012 4C084/ZA362 4C084/ZA402 4C084/ZA512 4C084/ZB052 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB322 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/ZA01 4C086/ZA36 4C086/ZA40 4C086/ZA51 4C086/ZB05 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB32 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	60/152248 1999-09-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及新的IgSF多肽和分离的核酸，其包含编码此类多肽的基因的编码区。还提供了用于产生载体，宿主细胞，抗体和IgSF多肽的重组方法。本发明进一步涉及可用于诊断和治疗涉及这些新型IgSF多肽的疾病的诊断和治疗方法。本发明提供了用于诊断受试者的病理状况或对病理状况的敏感性的方法。

(表 1)

遺伝子 番号	cDNA クローン ID	ATCC 登録 番号 Z 取得日時	ベクター	プラスミド 番号 X	読み 取り 位置 番号	加 入 配列 番号	加 入 配列 番号	開始 位置の 5' 番号	終了 位置の 番号	ORF の長さ 番号
1	HRACW30	PTA621 09/02/99	pCMVSPORT 3.0	2	1033	1	1033	10	8	240
2	HTPFG82	PTA2330 08/07/00	Uni-ZAP XR	3	2487	1	2487	430	9	613
3	HOFNK31	PTA621 09/02/99	pCMVSPORT 2.0	4	873	1	873		10	117
4	HHPEK94	PTA621 09/02/99	Uni-ZAP XR	5	3040	1092	3040	890	11	316
5	HFIYV36	PTA621 09/02/99	pSport1	6	1753	1	1753	65	12	182
6	HNGCM03	PTA621 09/02/99	Uni-ZAP XR	7	1182	1	1182		13	218